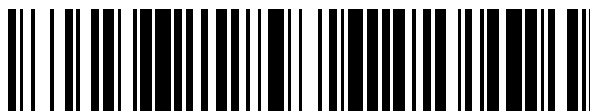


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 685**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2016** **PCT/EP2016/066353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017** **WO17009258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2016** **E 16739079 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 3319993**

54 Título: **Productos conjugados de anticuerpo-fármaco específicos de AXL para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

10.07.2015 WO PCT/EP2015/065900
13.01.2016 US 201662278283 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BOSHUIZEN, JULIA;
JACOBSEN, KIRSTINE;
BREIJ, ESTHER;
KOOPMAN, LOUISE;
SATIJN, DAVID;
VAN DEN BRINK, EDWARD;
VERZIJL, DENNIS;
DE JONG, ROB;
VAN DIJKHUIZEN RADERSMA, RIEMKE;
PEEPER, DANIEL;
DITZEL, HENRIK JØRN y
PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 784 685 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

Productos conjugados de anticuerpo-fármaco específicos de AXL para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que se unen a AXL humana para uso terapéutico, particularmente para el tratamiento de cánceres resistentes o refractarios.

10 **Antecedentes de la invención**

AXL es una proteína transmembrana de 104-140 kDa que pertenece a la subfamilia TAM de Receptores Tirosina Quinasa (RTK) de mamíferos y que tiene capacidades de transformación (Paccez *et al.* 2014). El dominio extracelular de AXL se compone de una combinación de dos dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) N-terminales distales de membrana (dominios Ig1 e Ig2) y dos repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII) proximales de membrana (los dominios FN1 y FN2) (Paccez *et al.* 2014). Se ha informado sobre la expresión de AXL potenciada o *de novo* en una variedad de cánceres, incluidos los gástricos, de próstata, de ovario y de pulmón (Paccez *et al.* 2014). Cabe destacar que se ha encontrado que varios tipos de cáncer con resistencia a inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de serina/treonina quinasa y/o quimioterapia muestran proteína AXL potenciada o *de novo*. En particular, las células tumorales con resistencia a la terapia dirigida al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (Wilson *et al.* 2014; Brand *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2012; Blakely *et al.* 2012) o inhibidores de la vía B-raf (BRAF) (Müller *et al.* 2014) mostraron expresión de AXL potenciada o *de novo*. Además, se informó sobre la expresión de AXL potenciada o *de novo* en células de cáncer de cabeza y cuello (SCCHN) resistentes al inhibidor de PI3K BYL719 (Elkabets *et al.* 2015), en cáncer de mama resistente al agente dirigido a HER2 lapatinib (Liu *et al.* 2009), en tumores del estroma gastrointestinal (GIST) resistentes a imatinib (Mahadevan *et al.* 2015), en cáncer renal resistente a sunitinib (Zhou *et al.* 2015), en células de neuroblastoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) resistente al inhibidor de ALK crizotinib (Debruyne *et al.* 2015; Kim *et al.* 2013), en cáncer de esófago resistente al cisplatino (Hong *et al.* 2013), en rhabdomyosarcoma resistente al anticuerpo IGF-IR MAB391 (Huang *et al.* 2010), en leucemia mieloide aguda (AML) resistente a los inhibidores de FLT3 midostaurina (PKC412) o quizartinib (AC220) (Park *et al.* 2015), en AML resistente a fármacos (Hong *et al.* 2008) y en leucemia mieloide crónica resistente a imatinib (Dufies *et al.* 2011). La expresión de AXL también se indujo en células de cáncer de próstata con resistencia adquirida a metformina (Bansal *et al.* 2015).

El AXL puede activarse al unirse su ligando, el factor 6 específico de detención del crecimiento dependiente de la vitamina K (Gas6). La unión de Gas6 a AXL conduce a la dimerización de AXL, la autofosforilación y la activación posterior de vías de señalización intracelular, como PI3K/AKT, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), STAT y NF- κ B cascadas (Leconet *et al.* 2013). En las células cancerosas, la expresión de AXL se ha asociado con la motilidad, invasión, migración de las células tumorales y está involucrada en la transición epitelial a mesenquimatosas (EMT) (Linger *et al.* 2010).

La inhibición dirigida de AXL y/o su ligando Gas6 puede ser eficaz como terapia antitumoral utilizando, p. ej., moléculas pequeñas o anticuerpos anti-AXL (Linger *et al.* 2010). Se han descrito anticuerpos anti-AXL que atenúan el crecimiento de xenoinjerto de NSCLC y cáncer de mama *in vivo* por regulación por disminución de la expresión del receptor, reduciendo la proliferación de células tumorales e induciendo apoptosis (Li *et al.* 2009; Ye *et al.* 2010; WO 2011/159980, Genentech). También se han informado varios otros anticuerpos anti-AXL (Leconet *et al.* 2013; Iida *et al.* 2014; documento WO 2012/175691, INSERM; documento WO 2012/175692, INSERM; documento WO 2013/064685 Pierre Fabré Medicaments; documento WO 2013/090776, INSERM; documento WO 2009/063965, Chugai Pharmaceuticals y documento WO 2010/131733), incluido un ADC basado en un anticuerpo anti-AXL y un dímero de pirrolobenzo-diazepina (PBD) (documento WO 2014/174111, Pierre Fabré Medicament y Spirogen Sari).

Breij *et al.*, "Novel antibody-drug conjugates targeting Axl show anti-tumor activity in solid cancer xenograft models", American Association of Cancer Research, 19 de abril de 2015, pág. 1-2 (XP055296816), describe el uso de productos conjugados de fármacos con anticuerpos anti-AXL (ADC) para tratar el cáncer de pulmón y los carcinomas epidermoides. Los anticuerpos anti-AXL se conjugaron con MMAE.

Breij *et al.*, Journal of Clinical Oncology, vol. 33, 29 de mayo de 2015, pág. 1-2 (XP055297040) describe el uso de un anticuerpo contra AXL conjugado con MMAE para destruir las células de cáncer de pulmón *in vivo*.

El documento WO 2014/068139 describe los anticuerpos anti-AXL, 1003A2 y 1024G11 y sus productos conjugados con saporina para destruir varias líneas celulares tumorales.

El documento WO 2016/005593 describe anticuerpos anti-AXL inhibidores que inhiben el crecimiento tumoral y no compiten con el ligando GAS6 para unirse a AXL, y su uso como ADC con MMAE para destruir varios tipos de cáncer *in vivo*, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma cervical, cáncer de esófago, carcinoma

epidermoide y cáncer de páncreas.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para tratar los cánceres que son, o que tienen una alta tendencia a volverse, resistentes a los inhibidores de tirosina quinasa, los inhibidores de serina/treonina quinasa y/o la quimioterapia, particularmente utilizando los ADC contra AXL.

Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que los ADC basados en anticuerpos anti-AXL se pueden utilizar para tratar eficazmente cánceres que son resistentes, o que tienen una alta tendencia a volverse resistentes, a ciertos agentes terapéuticos.

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana para su uso en el tratamiento del cáncer resistente a al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico en donde el ADC comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente.

Este aspecto y las realizaciones y descripciones, incluido el uso de ADC contra AXL basados en anticuerpos anti-AXL caracterizados por sus propiedades o secuencias de unión a antígeno, radicales terapéuticos adecuados para tales ADC, combinaciones de tales ADC con ciertos agentes terapéuticos y métodos de tratamiento de las neoplasias resistentes se describe con más detalle a continuación.

Leyendas de las figuras

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-humano se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Se probaron las siguientes proteínas quiméricas de AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y AXL de *Mus musculus* (mmAXL): (A) hsAXL y simulada, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmLg1, (D) hsAXL-mmLg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 3: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos anti-AXL en células A431. La citotoxicidad mediada por células 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 (ADC contra AXL). La unión de ADC contra AXL 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.

Figura 6: Variantes VH y VL de anticuerpo que permiten la unión a AXL. Los anticuerpos con regiones VL o VH idénticas se alinearon 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 los ADC en células LCLC-103H se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

Figura 8: Actividad antitumoral por anticuerpos 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.

Figura 10: (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con los ADC contra AXL del modelo PAXF1657. Un Humab contra AXL (C) no conjugado y un ADC no dirigido (D) no muestran actividad antitumoral, lo que indica que la capacidad terapéutica de ADC contra AXL 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 de AXL de ratón-humano se realizó como se describe en el Ejemplo 11. Se probaron las siguientes proteínas quiméricas de AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y *Mus musculus* AXL (mmAXL): (A) hsAXL y simulada, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmLg1, (D) hsAXL-mmLg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 12: La unión de Gas6 humana (hGas6) sobre 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 de xenoinjerto A431 terapéutico, que produce altos niveles de Gas6 endógena, 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 endógena, 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 ADC contra AXL 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, cuello uterino y endometrio. La intensidad media de tinción (DO) 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 con inmunotinción de 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 contra AXL a células HEK293 transfectadas con AXL humana (A), MER humano (B), TYRO3 humano (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, 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. Se incluyeron IgG1-b12 y Fab-TAMRA/QSY7 solos como controles negativos.

Figura 21: (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo 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 ADC contra AXL 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 ADC de control de isotipo, 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 ADC contra AXL 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 Qifit, 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 de IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Figura 25: Mejora de la eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) resistente a erlotinib combinado con erlotinib. Tamaño tumoral promedio después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib combinado con IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo NSCLC PDX LU2511. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y ADC de control de isotipo, respectivamente. *, p <0,05; **, p <0,01; ns, no significativo (prueba ANOVA de una vía).

Figura 26: Expresión de proteína Axl mejorada en líneas celulares de NSCLC con resistencia adquirida a TKI de EGFR. La expresión de la proteína Axl se determinó mediante transferencia Western. La tinción de actina se utilizó como control para la carga igual de proteínas. La expresión de Axl se evaluó en células que se habían cultivado en presencia (+) o ausencia (-) de erlotinib.

Figura 27: Sensibilidad de las células HCC827 y PC9 parentales (de tipo salvaje) y resistentes a erlotinib a

IgG1-AXL-107-vcMMAE (A, B, F, G, H, J, K) o TKI de EGFR (C, D, E, y I) se evaluó en ensayos de viabilidad. Las líneas celulares parentales (de tipo salvaje) y resistentes a erlotinib se expusieron a concentraciones crecientes de IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib, gefitinib o afatinib durante 4 o 5 días después de lo cual se determinó la viabilidad celular como se describe en el Ejemplo 22.

Figura 28. Expresión de AXL en líneas celulares de melanoma establecidas y líneas de melanoma primario con pocos pasajes derivadas del paciente (PDX). (A) Se observaron niveles variables de expresión de AXL en las líneas celulares de melanoma establecidas. Se observó una expresión de AXL mejorada o de novo en líneas celulares resistentes a PLX4720 (A375-R, SKMEL28R, SKMEL147). (B) Se observó expresión de AXL en 8/15 líneas de melanoma primario derivadas de pacientes. Tanto en las líneas celulares de melanoma establecidas como en los cultivos PDX con pocos pasajes, la expresión de AXL se correlacionó inversamente con la expresión de MITF.

Figura 29. Expresión de la proteína AXL en la superficie celular. Ejemplos de expresión de AXL según lo determinado mediante citometría de flujo cuantitativa en una línea celular de melanoma negativa para Axl y positiva para Axl. Las gráficas de color gris claro representan la tinción con anticuerpos específicos de AXL, mientras que las gráficas de color gris oscuro representan la tinción con anticuerpo de control de isotipo.

Figura 30. Sensibilidad de las líneas celulares de melanoma establecidas a IgG1-AXL-107-vcMMAE. Las líneas celulares de melanoma (A-F; CDX) se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE o el ADC de control de isotipo IgG1-b12-vcMMAE durante 5 días por triplicado. La viabilidad celular se evaluó con un ensayo CellTiter-Glo y se trazó frente a la concentración de ADC.

Figura 31. Sensibilidad de los cultivos de células de melanoma primario a IgG1-AXL-107-vcMMAE. Las líneas celulares de melanoma primario con pocos pasajes (A-C; PDX) se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE o el ADC de control de isotipo IgG1-b12-vcMMAE durante 8 días por triplicado. La viabilidad celular se evaluó con un ensayo CellTiter-Glo y se trazó frente a la concentración de ADC.

Figura 32. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) LU0858 NSCLC resistente a erlotinib. Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib combinado con IgG1-AXL-107-vcMMAE (A). IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y ADC de control de isotipo, respectivamente. Se muestran el tamaño medio del tumor y el ETM de cada grupo por punto de tiempo y el tamaño del tumor por ratón individual por grupo el día 11 (B) y el día 21 (C). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ns, no significativo (prueba de Mann-Whitney).

Figura 33. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) LU1868 NSCLC resistente a erlotinib. Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib combinado con IgG1-AXL-107-vcMMAE (A). IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE se incluyeron como anticuerpo de control de isotipo y ADC de control de isotipo, respectivamente. Se muestran el tamaño medio del tumor y el ETM de cada grupo por punto de tiempo y el tamaño del tumor por ratón individual por grupo el día 21 (B), el día 28 (C) y el día 31 (D). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ns, no significativo (prueba de Mann-Whitney).

Figura 34. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con NSCLC LXFA 526 resistente a erlotinib. (A) Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib combinado con IgG1-AXL-107-vcMMAE. (B) Tamaño promedio del tumor y ETM de cada grupo por punto de tiempo y tamaño del tumor por ratón individual por grupo el día 23. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ns, no significativo (prueba de Mann-Whitney).

Figura 35. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con NSCLC LXFA 677 (A) y LXFA 677_3 (C), que ha adquirido resistencia al erlotinib. Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib combinado con IgG1-AXL-107-vcMMAE. (B, D) Tamaño medio del tumor y ETM de cada grupo por punto de tiempo y tamaño del tumor por ratón individual por grupo el día 21 del modelo LXFA 677 (B) o el día 37 del modelo LXFA 677_3 (D). *, p < 0,05; **, p < 0,01; ns, no significativo (prueba de Mann-Whitney).

Figura 36. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de melanoma SKMEL147. Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107 o IgG1-AXL-107-vcMMAE (A). El tamaño del tumor en ratones IgG1-AXL-107-vcMMAE que se observaron (n = 2) o se volvieron a tratar con IgG1-AXL-107-vcMMAE (n = 4) se muestra en (B).

Figura 37. Las células SKMEL28 de tipo salvaje (color rojo) y las células SKMEL28-R resistentes a PLX4720 (color verde) se mezclaron 1:1 y se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE (ADC contra AXL), IgG1-b12-MMAE (b12-ADC), PLX4720 (PLX), dabrafenib (dabr), trametinib (tram) o combinaciones como se indica. (A) Número total de células en relación con las células no tratadas. (B) Razón GFP/mCherry correspondiente a la razón de células SKMEL28-R/SKMEL28.

Figura 38. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo PDX de cáncer de cuello uterino CV1664. (A) Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-107-vcMMAE o paclitaxel. (B) Se muestra el tamaño medio del tumor y el ETM de cada grupo por punto de tiempo y el tamaño del tumor por ratón individual por grupo el día 46. (C, D) Se muestra el tamaño promedio del tumor en ratones tratados con IgG1-AXL-107-vcMMAE -(C) o paclitaxel (D) que se volvieron a tratar con IgG1-AXL-107-vcMMAE. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ns, no significativo

(prueba de Mann-Whitney).

Figura 39. Ejemplos de expresión de Axl detectada mediante inmunohistoquímica en muestras de melanoma primario. (A) Ejemplo de melanoma con intensidad de tinción de Axl +++ positiva (B) Ejemplo de melanoma con intensidad de tinción de Axl positiva entre + y ++ (C) Ejemplo de expresión de Axl en tejidos de melanoma del mismo paciente antes y después del tratamiento con vemurafenib; izquierda = pre-vemurafenib, intensidad de tinción de Axl débilmente +; derecha = post-vemurafenib, intensidad de tinción Axl débilmente + a ++ (D) Ejemplo de expresión de Axl heterogénea con intensidad ++ dentro del tejido de melanoma primario.

Descripción detallada de la invención

Aplicaciones terapéuticas

La invención se refiere a ADC específicos de AXL (también denominados "ADC contra AXL" en la presente memoria) como se define en cualquier aspecto o realización en la presente memoria, para su uso en el tratamiento de cánceres o tumores que son resistentes a ciertos agentes quimioterapéuticos, inhibidores de tirosina quinasa (p. ej., Inhibidores de EGFR), inhibidores de serina/treonina quinasa (p. ej., inhibidores de BRAF), como se describe en la presente memoria.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los ADC contra AXL son eficaces tanto *in vitro* como *in vivo* en la inducción de citotoxicidad en células tumorales resistentes a la terapia dirigida a EGFR, a la terapia dirigida a BRAF/MEK o a los agentes dirigidos a microtúbulos. Por ejemplo, las células NSCLC con resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR erlotinib, gefitinib y afatinib mostraron una reducción de la viabilidad tras el tratamiento con ADC contra AXL (Ejemplo 21), y los modelos resistentes a erlotinib con diferente estado del gen EGFR mostraron sensibilidad a ADC contra AXL (Ejemplo 22 AXL-ADC Tabla 17). Notablemente, en varios modelos tumorales donde el tratamiento con el inhibidor de EGFR elotinib no indujo actividad antitumoral, el tratamiento con ADC contra AXL o una combinación de ADC contra AXL y erlotinib indujo una potente actividad antitumoral (Ejemplo 22). Por ejemplo, una línea celular resistente a erlotinib derivada de una línea celular sensible a erlotinib era particularmente sensible a ADC contra AXL - se obtuvo una actividad antitumoral más fuerte a una dosis más baja (Ejemplo 22). Además, las líneas celulares de melanoma resistentes a los inhibidores de BRAF PLX4720 (un análogo de vemurafenib) o dabrafenib mostraron una mejor expresión de AXL y fueron sensibles al tratamiento con ADC contra AXL, y el ADC contra AXL mostró una fuerte actividad antitumoral en un modelo de melanoma *in vivo* resistente a PLX4720 (Ejemplo 23). Además, el ADC contra AXL indujo una regresión tumoral completa o parcial en un modelo tumoral de cáncer de cuello uterino donde los tumores habían progresado después del tratamiento con paclitaxel (Ejemplo 24).

Por lo tanto, la presente descripción proporciona un ADC contra AXL, por ejemplo, HuMax-AXL-ADC, para su uso en el tratamiento del cáncer resistente a al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3K, un anticuerpo antagonista contra un receptor tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico. En un aspecto, el agente terapéutico se selecciona entre un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico en el que el ADC comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente. En una realización concreta, el agente terapéutico se selecciona entre un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico.

La presente descripción también proporciona un ADC contra AXL, por ejemplo, HuMax-AXL-ADC, para su uso en el tratamiento de un cáncer combinado con un agente terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3K, un anticuerpo antagonista contra un receptor tirosina quinasa y un inhibidor de serina/treonina quinasa, en donde el ADC y el agente terapéutico se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente. El cáncer puede ser resistente al agente terapéutico y/o puede tener una alta tendencia a volverse resistente al agente terapéutico. El agente terapéutico se puede seleccionar en particular entre un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico.

Como se emplea en la presente memoria, un cáncer, tumor o similar "resistente", "resistente al tratamiento" o "refractario" significa un cáncer o tumor en un sujeto, en donde el cáncer o tumor no respondió al tratamiento con un agente terapéutico del inicio del tratamiento (en la presente memoria denominada "resistencia nativa") o inicialmente respondió al tratamiento con el agente terapéutico pero no respondió o fue menos sensible al agente terapéutico después de un cierto período de tratamiento (en lo sucesivo denominada "resistencia adquirida"), lo que da como resultado una enfermedad progresiva. Para los tumores sólidos, también una estabilización inicial de la enfermedad representa una respuesta inicial. Otros indicadores de resistencia incluyen recurrencia de un cáncer, aumento de la carga tumoral, metástasis recientemente identificadas o similares, a pesar del tratamiento con el agente terapéutico. Una persona experta en la técnica puede determinar si un tumor o cáncer es, o tiene una alta tendencia a

convertirse, en resistente a un agente terapéutico. Por ejemplo, la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN, www.nccn.org) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) proporcionan pautas para evaluar si un cáncer específico responde al tratamiento. Como se describe en la Tabla 1 a continuación y en otra parte de la presente memoria, se ha encontrado que los cánceres o tumores que desarrollan resistencia a ciertos agentes quimioterapéuticos (p. ej., agentes dirigidos a los microtúbulos ("MTA") tales como los taxanos), a los inhibidores de tirosina quinasa (p. ej., inhibidores de EGFR), a inhibidores de serina/treonina quinasa (p. ej., inhibidores de BRAF o MEK), a inhibidores de PI3K y a anticuerpos antagonistas expresan AXL.

Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" es típicamente un ser humano al que se administra el ADC contra AXL, que incluye, por ejemplo, pacientes humanos a los que se ha diagnosticado un cáncer que se puede tratar mediante la destrucción de células que expresan AXL, directa o indirectamente.

Como se emplea en la presente memoria, un cáncer que "tiene una alta tendencia" a la resistencia a un agente terapéutico específico es un cáncer que se sabe que está asociado con una alta tendencia a ser o volverse resistente o refractario al tratamiento con una determinada clase de fármacos. Por ejemplo, un paciente con cáncer que está siendo tratado o que se ha determinado que es elegible para el tratamiento con un agente terapéutico como se describe en la presente memoria para el cual existe una correlación entre resistencia y expresión potenciada o *de novo* de AXL, sufre de un cáncer que tiene una alta tendencia a la resistencia. Los ejemplos no limitantes de cánceres y agentes terapéuticos que se sabe que están asociados con una expresión potenciada o *de novo* de AXL y que, por tanto, pueden tener una alta tendencia a volverse resistentes al agente terapéutico, se muestran en la Tabla 1 a continuación. Además, como se muestra en el Ejemplo 24, el ADC contra AXL indujo una regresión tumoral completa o parcial en un modelo tumoral de cáncer cervical en el que los tumores habían progresado después del tratamiento con paclitaxel. Otros tipos de cáncer y tipos de tumor con resistencia nativa o adquirida a un agente terapéutico y sensibles al tratamiento con ADC contra AXL también se describen en otra parte de la presente memoria.

Tabla 1 - Ejemplos de agentes terapéuticos que inducen una expresión potenciada o de novo de AXL

Tipo de tumor	Compuesto	Diana/MoA	Clase	Ref.
NSCLC	Erlotinib	EGFR	TKI	Zhang (2012), Wilson (2014)
NSCLC	Crizotinib	ALK	TKI	Kim (2013)
Cáncer de mama	Lapatinib	HER2, EGFR	TKI	Liu (2009)
Cáncer de mama	Afatinib	EGFR	TKI	Zhang (2012)
GIST	Imatinib, sunitinib	ABL/PDGFR/cKIT	TKI	Mahadevan (2015)
Cáncer renal	Sunitinib	VEGFR/PDGFR/cKIT	TKI	Zhou (2015)
Neuroblastoma	Crizotinib	ALK	TKI	Debruyne (2015)
AML	midostaurina (PKC412)	FLT3	TKI	Park (2015)
AML	Quizartinib (AC220)	FLT3	TKI	Park (2015)
CML	Imatinib	ABL/PDGFR/cKIT	TKI	Dufies (2011)
SCCHN	Alpelisib (BYL719)	PI3K	PI3KI	Elkabets (2015)
SCCHN	Cetuximab	EGFR	mAb/rTKI	Brand (2015)
Rabdomiosarcoma	MAB391	IGF-IR	mAb/rTKI	Huang (2010)
Melanoma	Vemurafenib (PLX4032)	BRAF	S/Th KI	Müller (2014) Konieczkowski (2014)
	PLX4720; *	BRAF		
	Selumetinib (AZD6244); **	MEK		
	VTX11E ***	ERK2		
Cáncer de páncreas	Selumetinib (AZD6244)	MEK	S/Th KI	Pettazzoni (2015)
Cáncer de esófago	Cisplatino	Reticulación de ADN	Quimio	Hong (2013)

Tipo de tumor	Compuesto	Diana/MoA	Clase	Ref.
Cancer de prostata	Metformina	Fármaco diabético, citostático	Quimio	Bansal (2015)
AML	Doxorrubicina, etopósido, cisplatino	Bombas de resistencia a la regulación por incremento	Quimio	Hong (2008)
SCCHN	Cisplatino/carboplatino	Entrecruzamiento de ADN	Quimio	Brand (2015)
* N-(3-(5-cloro-1H-pirrol-2-yl)-4-(2,3-difluorofenil)propano-1-sulfonamida ** 6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida *** 4-[2-(2-Cloro-4-fluoroanilino)-5-metilpirimidin-4-il]-N-[(1S)-1-(3-clorofenil)-2-hidroxietil]-1H-pirrol-2-carboxamida				

Un "inhibidor de tirosina-quinasa" o "TKI", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un compuesto, típicamente un producto farmacéutico, que inhibe la tirosina quinasa o la señalización aguas abajo de las tirosina quinasa. Las tirosina quinasa son enzimas responsables de la adición de un grupo fosfato a una tirosina de una proteína (fosforilación), una etapa que inhibe los TKI, ya sea directa o indirectamente. La fosforilación de la tirosina da como resultado la activación de cascadas de transducción de señales intracelulares. Muchos TKI son útiles para la terapia del cáncer. Los ejemplos no limitantes de tales TKI y sus dianas se muestran en la Tabla 1 anterior e incluyen, p. ej., Inhibidores de EGFR tales como erlotinib. En una realización, el término inhibidor de tirosina quinasa como se emplea en la presente memoria se refiere a compuestos que inhiben específicamente la actividad de fosforilación de proteínas de una tirosina quinasa, p. ej., la actividad tirosina quinasa del EGFR.

Si bien muchos TKI en uso clínico son productos farmacéuticos de molécula pequeña, también existen "inhibidores del receptor tirosina quinasa" (rTKI), tales como los anticuerpos antagonistas que se unen a la porción extracelular de un receptor tirosina quinasa (en lo sucesivo, "mAb/rTKI"), inhibiendo así la señalización mediada por el receptor. Los ejemplos de tales anticuerpos son cetuximab y MAB391.

Un "inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa" o "PI3KI" como se emplea en la presente memoria se refiere a un compuesto, típicamente un producto farmacéutico, que inhibe una enzima en la ruta PI3K/AKT. Los ejemplos de PI3KI incluyen Alpelisib (BYL791).

Un "inhibidor de serina/treonina quinasa" o "S/Th KI", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un compuesto, típicamente un producto farmacéutico, que inhibe las serina/treonina quinasa tales como BRAF o MEK o vías de señalización aguas abajo de dichas serina/treonina quinasa tal como a través de las vías BRAF/MEK. Las serina/treonina quinasa son enzimas responsables de la fosforilación del grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina, una etapa que inhibe las S/Th KI, ya sea directa o indirectamente. La fosforilación de serinas o treoninas da como resultado la activación de cascadas de transducción de señales intracelulares. En la Tabla 1 anterior se muestran ejemplos de KI S/Th útiles para la terapia contra el cáncer y sus dianas, e incluyen inhibidores de BRAF tales como vemurafenib y sus análogos o derivados. En una realización, el término inhibidor de serina/treonina quinasa como se emplea en la presente memoria se refiere a compuestos que inhiben específicamente la actividad de fosforilación de proteínas de una serina/treonina quinasa, por ejemplo, la actividad serina/treonina quinasa de una BRAF o MEK mutantes.

Vemurafenib (PLX4032) es un inhibidor de molécula pequeña de BRAF quinasa mutada, biodisponible por vía oral, competitivo con ATP, que se une selectivamente e inhibe BRAF que comprende ciertas mutaciones, lo que da como resultado una inhibición de una vía de señalización de MAPK activada en exceso aguas abajo en células tumorales que expresan el BRAF quinasa mutante. Las mutaciones de BRAF identificadas en los cánceres humanos generalmente se encuentran en el bucle P rico en glicina del lóbulo N y el segmento de activación y las regiones flanqueantes dentro del dominio quinasa. Vemurafenib se une e inhibe la quinasa BRAF que tiene ciertas de estas mutaciones, tales como, entre otras, una sustitución de aminoácido en el residuo V600 (p. ej., V600E), residuo L597 (p. ej., L597R; Bahadoran *et al.* 2013); y residuo K601 (Dahlman *et al.* 2012).

Como se emplea en la presente memoria, un "derivado" de un fármaco es un compuesto que es derivado o derivable, por reacción química directa, del fármaco. Como se emplea en la presente memoria, un "análogo" o "análogo estructural" de un fármaco es un compuesto que tiene una estructura y/o mecanismo de acción similar al fármaco pero que difiere en al menos un elemento estructural. Los análogos o derivados "terapéuticamente activos" de un medicamento tales como, p. ej., vemurafenib o erlotinib, tienen una eficacia terapéutica similar o mejorada en comparación con el fármaco, pero pueden diferir en, p. ej., uno o más de estabilidad, especificidad de diana, solubilidad, toxicidad y similares.

Las Tablas 2 y 3 a continuación muestran los inhibidores de BRAF y EGFR que tienen un mecanismo de acción similar (inhibición de BRAF o EGFR, respectivamente) tales como vemurafenib y erlotinib, respectivamente.

Tabla 2 - Inhibidores de BRAF

Nombre del inhibidor	
Vemurafenib (PLX4032) (PLX4720 = compuesto herramienta)	Bollag (2012)
GDC-0879 *	Wong (2009)
Dabrafenib (GSK2118436)	Hong (2012)
Encorafenib (LGX818)	Li (2016)
Sorafenib (BAY 43-9006)	Hilger (2002)
RAF265 (CHIR-265)	Mordant (2010)
SB590885 **	King (2006)
AZ628 ***	Montagut (2008)
* Oxima de (E)-5-(1-(2-hidroxietil)-3-(piridin-4-il)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidroinden-1-ona	
** Oxima de (E)-5-(2-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-4-(piridin-4-il)-1H-imidazol-5-il)-2,3-dihidroinden-1-ona	
*** 3-(2-cianopropan-2-il)-N-(4-metil-3-(3-metil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-6-ilamino)fenil)benzamida	

Tabla 3 - Inhibidores de EGFR

Nombre	Clase	
Erlotinib	TKI	Pollack (1999)
Gefitinib	TKI	Sirotnak (2000)
Afatinib	TKI	Li (2008)
Lapatinib	TKI	Xia (2002)
Icotinib	TKI	Tan 2012
Vandetanib	TKI	Herbst (2007)
Osimertinib	TKI	Greig (2016)
Rociletinib	TKI	Sequist (2015)
Cetuximab	mAb/rTKI	Prewett (1996)
Panitumumab	mAb/rTKI	Yang (2001)
zalutumumab	mAb/rTKI	Bleeker (2004)
Nimotuzumab	mAb/rTKI	Talavera (2009)
Matuzumab	mAb/rTKI	Kim (2004)
necitumumab (IMC-11F8)	mAb/rTKI	Li (2008)
sym004	mAb/rTKI	Pedersen (2010)
mab 806	mAb/rTKI	Mishima (2001)
MM-151	mAb/rTKI	Merrimack

5 En consecuencia, como se muestra en la presente memoria, resistencia del melanoma a vemurafenib, dabrafenib, trametinib o combinaciones de dos o más de los mismos; y la resistencia de NSCLC a erlotinib, gefitinib o afatinib, o combinaciones de dos o más de los mismos, pueden estar asociadas con la expresión potenciada o *de novo* de AXL por las células tumorales. Por lo tanto, estos tumores pueden ser elegibles para el tratamiento con un ADC específico de AXL.

10 La presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, en donde el cáncer es resistente a al menos un agente terapéutico seleccionado entre un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico, comprendiendo el método administrar un ADC contra AXL. El cáncer puede, por ejemplo, haber adquirido resistencia durante un tratamiento previo o aún en curso con el agente terapéutico.

15 Alternativamente, el cáncer era resistente desde el inicio del tratamiento con el agente terapéutico. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. El agente terapéutico puede ser un inhibidor de PI3K o un mAb/rTKI.

La presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar un ADC contra AXL combinado con al menos un agente terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa o un inhibidor de serina/treonina quinasa, en donde el ADC y el agente terapéutico se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente. El cáncer puede tener una alta tendencia a la resistencia al agente terapéutico. El cáncer puede ser resistente al agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un inhibidor de PI3K o un mAb/rTKI.

Como muestran los autores de la presente invención y en la Tabla 1 anterior, en ciertos tipos de cáncer, el desarrollo de resistencia se ha asociado con una expresión de AXL potenciada o *de novo*. Tales cánceres pueden incluir, entre otros, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), cáncer de mama, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer renal, neuroblastoma, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, leucemia mieloide aguda (AML), y leucemia mieloide crónica (CML).

El cáncer o tumor se pueden seleccionar entre cáncer cervical, melanoma, NSCLC, SCCHN, cáncer de mama, GIST, cáncer renal, neuroblastoma, cáncer de esófago y rabdomiosarcoma. En otra realización, el cáncer es un cáncer hematológico seleccionado entre AML y CML.

El cáncer o tumor se pueden caracterizar por al menos una mutación en la secuencia de aminoácidos de EGFR seleccionada entre L858R y T790M, tal como, por ejemplo, L858R o T790M/L858R. Por ejemplo, el cáncer o tumor puede ser un NSCLC.

El al menos un agente terapéutico puede consistir o puede comprender un inhibidor TKI que es un antagonista de EGFR, un antagonista de HER2, un inhibidor de ALK, un inhibidor de FLT3, o una combinación de dos o más de los mismos. Los TKI preferidos no limitantes incluyen erlotinib, gefitinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib, imatinib, sunitinib, afatinib, crizotinib, midostaurin (PKC412) y quizartinib (AC220). En una realización, el TKI es un inhibidor de EGFR, tal como erlotinib o un análogo o derivado terapéuticamente activo del mismo, p. ej., afatinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib o gefitinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser erlotinib y el cáncer puede ser un NSCLC, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al erlotinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser erlotinib y el cáncer puede ser un cáncer pancreático, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al erlotinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser gefitinib y el cáncer puede ser un NSCLC, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al gefitinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser crizotinib y el cáncer puede ser un NSCLC, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al crizotinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser lapatinib y el cáncer puede ser un cáncer de mama, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al lapatinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser imatinib y el cáncer es una CML, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al imatinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser imatinib y el cáncer puede ser un GIST, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al imatinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser sunitinib y el cáncer puede ser un GIST, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al sunitinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser sunitinib y el cáncer puede ser un cáncer renal, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al sunitinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser crizotinib y el cáncer puede ser un neuroblastoma, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al crizotinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser midostaurina (PKC412) y el cáncer puede ser AML, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a la midostaurina.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser quizartinib y el cáncer puede ser resistente a la AML o tener una alta tendencia a volverse resistente al quizartinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser afatinib y el cáncer puede ser un cáncer de mama, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al afatinib.

5 El inhibidor de tirosina quinasa puede ser axitinib y el cáncer puede ser un cáncer renal, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al axitinib.

El inhibidor de tirosina quinasa puede ser lenvatinib y el cáncer es un cáncer de tiroides, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al lenvatinib.

10 La presente descripción contempla particularmente que el inhibidor de tirosina quinasa sea un agente inhibidor de EGFR, tal como, p. ej., erlotinib o un análogo terapéuticamente activo o derivado del mismo, preferiblemente en donde el cáncer es un NSCLC, resistente o que tiene una alta tendencia a volverse resistente al agente inhibidor de EGFR. Específicamente, el cáncer o tumor (por ejemplo, el NSCLC) se puede caracterizar por al menos una mutación en el EGFR seleccionado entre L858R y T790M, o una combinación de los mismos.

15 El al menos un agente terapéutico puede consistir o comprender un inhibidor de PI3K. Los inhibidores de PI3K preferidos no limitantes incluyen alpelisib y análogos terapéuticamente activos y derivados de los mismos.

20 El PI3Ki puede ser alpelisib (BYL719) y el cáncer puede ser un SCCHN, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al alpelisib.

El al menos un agente terapéutico puede consistir o comprender un anticuerpo antagonista que se une a la porción extracelular de un receptor tirosina quinasa. Los mAb/rTKI preferidos no limitantes incluyen cetuximab y anti-IGF-IR MAB391, así como análogos o derivados terapéuticamente activos de cetuximab y MAB391.

25 El mAb/rTKI puede ser cetuximab y el cáncer puede ser un SCCHN, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al cetuximab.

30 El mAb/rTKI puede ser un anticuerpo anti-IGF-IR MAB391 y el cáncer puede ser un SCCHN, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a MAB391.

El al menos un agente terapéutico puede consistir o comprender un S/Th KI que es un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK o una combinación de los mismos. El S/Th KI puede ser un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib (PLX4032) o un derivado o análogo terapéuticamente eficaz del mismo, por ejemplo, PLX4720 o dabrafenib; o VTXKIIE. El S/Th KI puede ser un inhibidor de MEK, tal como selumetinib (AZD6244) o trametinib.

35 El S/Th KI puede ser vemurafenib y el cáncer puede ser un melanoma, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al vemurafenib.

40 El S/Th KI es vemurafenib y el cáncer puede ser un cáncer colorrectal, resistente o con alta tendencia a volverse resistente a vemurafenib.

El s/Th KI puede ser dabrafenib y el cáncer puede ser un melanoma, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al dabrafenib.

45 El S/Th KI puede ser dabrafenib y el cáncer puede ser un cáncer colorrectal, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al dabrafenib.

50 El S/Th KI puede ser selumetinib y el cáncer puede ser un cáncer pancreático, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al selumetinib.

El S/Th KI puede ser selumetinib y el cáncer puede ser un melanoma, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al selumetinib.

55 El inhibidor de S/Th KI puede ser trametinib y el tumor puede ser un melanoma, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al trametinib.

El S/Th KI puede ser VTXKIIE y el cáncer puede ser un melanoma, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a VTXKIIE.

60 El S/Th KI puede ser PLX4720 y el cáncer puede ser un melanoma, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a PLX4720.

El al menos un agente terapéutico puede consistir o comprender un inhibidor de BRAF. En una realización concreta,

el inhibidor de BRAF es vemurafenib (PLX4032) o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, tal como dabrafenib o PLX4720. El inhibidor de BRAF puede ser vemurafenib o un derivado o análogo terapéuticamente activo del mismo, y el tumor puede ser un melanoma resistente o que tenga una alta tendencia a volverse resistente a vemurafenib. Vemurafenib puede ser un inhibidor de la quinasa BRAF que alberga ciertas mutaciones, tales como mutaciones ubicadas en el bucle P rico en glicina del lóbulo N y el segmento de activación y las regiones flanqueantes dentro del dominio quinasa. El análogo de vemurafenib puede ser dabrafenib.

El ADC contra AXL proporcionado por la presente descripción se puede utilizar concretamente para el tratamiento de un melanoma que expresa AXL resistente a un agente terapéutico con el cual el melanoma está siendo tratado o ha sido tratado, en donde el agente terapéutico es vemurafenib o un análogo terapéuticamente eficaz o derivado del mismo, y en donde el melanoma exhibe una mutación en BRAF. En particular, el melanoma puede exhibir una mutación en BRAF que hace que el BRAF sea sensible a la inhibición por vemurafenib o el análogo o derivado terapéuticamente eficaz. Las mutaciones no limitantes incluyen sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos; preferiblemente, la mutación es una sustitución de aminoácidos. Los residuos específicos para tales mutaciones incluyen, entre otros, V600 (p. ej., V600E, V600K y V600D), residuo L597 (p. ej., L597R); y residuo K601 (K601E). En una realización, la mutación se selecciona entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E.

En una realización, el al menos un agente terapéutico consiste o comprende un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, doxorubicina, etopósido, carboplatino y metformina o una combinación de los mismos. El agente terapéutico puede ser un agente dirigido a los microtúbulos, tal como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o vincristina, o un análogo o derivado terapéuticamente activo de cualquiera de los mismos. El al menos un agente terapéutico puede ser un taxano, tal como paclitaxel, docetaxel o un análogo o derivado terapéuticamente activo de paclitaxel o docetaxel.

El agente quimioterapéutico puede ser paclitaxel, y el cáncer puede ser cáncer cervical, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al paclitaxel.

El agente quimioterapéutico puede ser paclitaxel, y el cáncer puede ser un NSCLC, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al paclitaxel.

El agente quimioterapéutico puede ser paclitaxel, y el cáncer puede ser un cáncer de ovario, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al paclitaxel.

El quimioterapéutico puede ser docetaxel y el cáncer puede ser un cáncer de cabeza y cuello, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al docetaxel.

El quimioterapéutico puede ser docetaxel y el cáncer puede ser un cáncer gástrico, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al docetaxel.

El quimioterapéutico puede ser docetaxel y el cáncer es un cáncer de mama, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al docetaxel.

El quimioterapéutico puede ser docetaxel y el cáncer puede ser un cáncer de próstata, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al docetaxel.

El quimioterapéutico puede ser docetaxel y el cáncer puede ser un NSCLC, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al docetaxel.

El agente quimioterapéutico puede ser cisplatino, y el cáncer puede ser un cáncer de esófago, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al cisplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser cisplatino, y el cáncer puede ser un SCCHN, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al cisplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser carboplatino, y el cáncer puede ser un SCCHN, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al carboplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser cisplatino, y el cáncer puede ser una AML, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al cisplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser doxorubicina, y el cáncer puede ser una AML, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a la doxorubicina.

El agente quimioterapéutico puede ser el etopósido, y el cáncer puede ser una AML, resistente o con una alta

tendencia a volverse resistente al etopósido.

El agente quimioterapéutico puede ser metformina, y el cáncer puede ser un cáncer de próstata, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a la metformina.

El agente quimioterapéutico puede ser cisplatino, y el cáncer puede ser un cáncer de ovario, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente al cisplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser doxorrubicina, y el cáncer puede ser un cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), resistente o con alta tendencia a volverse resistente a doxorrubicina.

El agente quimioterapéutico puede ser la temozolomida, y el tumor puede ser un astrocitoma, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a la temozolomida.

El agente quimioterapéutico puede ser carboplatino, y el tumor puede ser un astrocitoma, resistente o con alta tendencia a volverse resistente al carboplatino.

El agente quimioterapéutico puede ser vincristina, y el tumor puede ser un astrocitoma, resistente o con una alta tendencia a volverse resistente a la vincristina.

La presente descripción se refiere a un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el cáncer es, o tiene una alta tendencia a volverse, resistente a un agente terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de PI3K, un mAb/rTKI y un inhibidor de serina/treonina quinasa, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana. En una realización, el agente terapéutico se selecciona entre un agente quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa y un inhibidor de serina/treonina quinasa. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser un taxano, el inhibidor de tirosina quinasa puede ser un inhibidor de EGFR y el inhibidor de serina/treonina quinasa puede ser un inhibidor de BRAF o MEK. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL.

La descripción se refiere a un método para tratar un NSCLC resistente a erlotinib en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana. En una realización, el método comprende adicionalmente administrar erlotinib, o un análogo o derivado del mismo, al sujeto. El cáncer puede ser un cáncer que expresa AXL.

La descripción se refiere a un método para tratar un melanoma resistente a vemurafenib en un sujeto, en donde el melanoma exhibe una mutación en BRAF y la mutación que proporciona la inhibición de vemurafenib de la actividad de quinasa BRAF del BRAF mutante, el método comprende administrar al sujeto un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana. La mutación puede ser una sustitución de aminoácido en el residuo V600, L597 y/o K601. La mutación se puede seleccionar entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El método puede comprender adicionalmente administrar vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo, al sujeto. El análogo puede ser dabrafenib. El cáncer puede ser un cáncer que expresa AXL.

La presente descripción se refiere a un método para tratar un cáncer cervical resistente al paclitaxel en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana. En una realización, el método comprende adicionalmente administrar paclitaxel, o un análogo o derivado del mismo, al sujeto. El cáncer puede ser un cáncer que expresa AXL.

En cuanto al ADC contra AXL, 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 ADC contra AXL empleadas 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 será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz 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 concreta o vía de administración seleccionada. Por ejemplo, como ya se indicó, se pueden utilizar las pautas de la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN, www.nccn.org) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) para evaluar los tratamientos contra el cáncer.

5 Un intervalo ilustrativo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC contra 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, 0,1- 5 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5-3 mg/kg o 0,5-2 mg/kg.

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

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (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.

15 En una realización, la ventana de eficacia-seguridad se optimiza disminuyendo la toxicidad específica tal como, por ejemplo, disminuyendo la razón fármaco-anticuerpo (DAR) y/o mezclando ADC contra AXL con anticuerpo anti-AXL no marcado.

20 La eficacia del tratamiento se puede controlar durante la terapia, p. ej. en puntos predefinidos en el tiempo. Los métodos para medir la eficacia generalmente dependen del tipo concreto de cáncer y son bien conocidos por un experto en la técnica. La eficacia se puede controlar 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 de un anticuerpo específico de AXL.

25 Si se desea, una dosis diaria eficaz de un ADC contra AXL puede ser 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. Los ADC contra AXL se pueden administrar mediante infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para minimizar los efectos secundarios no deseados.

30 También se puede administrar una dosis eficaz de un ADC contra AXL utilizando un período de dosificación semanal, bisemanal o trisemanasquincenal. El período de dosificación puede estar restringido a, p. ej., 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica. En una realización, un ADC contra AXL se administra una vez cada 3 semanas (1T3W) o tres administraciones durante 4 semanas (3T4W) para que el paciente reciba dieciséis o doce ciclos de ADC contra AXL a intervalos de tres semanas o cuatro semanas, por ejemplo, 48 semanas, extendiendo o repitiendo el régimen según sea necesario.

35 Por ejemplo, en una realización, el ADC contra AXL se puede 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.

40 El ADC contra AXL se puede administrar mediante perfusión cada tres semanas en una dosificación de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 50 y 200 mg/m². Tal administración se puede repetir, p. ej., 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.

45 Un ADC contra AXL se puede administrar como una dosis única de aproximadamente 0,1-10 mg/kg, tal como aproximadamente 1-3 mg/kg, cada semana o cada tres semana hasta doce veces, hasta ocho veces, o hasta que haya 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 después de 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.

50 Los ADC contra AXL se pueden administrar como terapia de mantenimiento, como, p. ej., una vez a la semana durante un período de seis meses o más. Como se emplea en la presente memoria, "terapia de mantenimiento" significa terapia con el propósito de evitar o retrasar la progresión o el retorno del cáncer. Típicamente, si un cáncer está en remisión completa después del tratamiento inicial, se puede utilizar la terapia de mantenimiento para evitar o retrasar el retorno del cáncer. Si el cáncer está avanzado y no se ha logrado la remisión completa después del

tratamiento inicial, la terapia de mantenimiento se puede utilizar para retrasar el crecimiento del cáncer, por ejemplo, para alargar la vida del paciente.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar como una dosificación diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, tal como aproximadamente 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, durante 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.

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 vayan a 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 la 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 vaya a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Como se describe en la presente memoria, el ADC contra AXL se puede utilizar combinado con al menos un agente terapéutico adicional. El al menos un agente terapéutico adicional puede comprender, o consistir en, el agente quimioterapéutico, el inhibidor de tirosina quinasa, el inhibidor de PI3K, el inhibidor de mAb/rTKI y/o serina/treonina quinasa al que el cáncer o tumor es resistente o tiene una alta tendencia a desarrollar resistencia, como se establece en las realizaciones anteriores.

El ADC contra AXL y los uno o más agentes terapéuticos se pueden administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente. Por ejemplo, en una realización, la combinación se utiliza para tratar a un paciente con cáncer que no ha recibido tratamiento previo con al menos un agente terapéutico. En otra realización, la combinación se utiliza para tratar a un paciente con cáncer en el que ha fallado el tratamiento previo con al menos un agente terapéutico. Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para el ADC contra AXL y el agente o los agentes terapéuticos dependen de la neoplasia, tumor o cáncer que se vayan a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la materia.

Las dosificaciones y los regímenes de dosificación para los uno o más agentes terapéuticos que se deben utilizar junto con el ADC contra AXL pueden ser iguales o esencialmente similares a los utilizados normalmente en el tratamiento de tal neoplasia, tumor o cáncer con los uno o más agentes terapéuticos. Las dosificaciones del agente o los agentes terapéuticos pueden ser más bajas que las utilizadas normalmente, pero el régimen de dosificación puede ser similar. Las dosificaciones del agente o los agentes terapéuticos pueden ser similares a las utilizadas normalmente, pero el régimen de dosificación se puede ajustar a menos administraciones o administraciones menos frecuentes.

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el cáncer es, o tiene una alta tendencia a volverse, resistente a un agente terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico, un inhibidor de tirosina quinasa y un inhibidor de serina/treonina quinasa, que comprende administrar al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) el agente terapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es un taxano, el inhibidor de tirosina quinasa es un inhibidor de EGFR y el inhibidor de serina/treonina quinasa es un inhibidor de BRAF o MEK. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. El ADC contra AXL se puede administrar, por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz de acuerdo con un régimen de dosificación descrito con más detalle anteriormente. Por ejemplo, como un ejemplo no limitante, el ADC contra AXL se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 0,02-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,05-10 mg/kg cada 1 semana (1T1W), cada 2 semanas (1T2W) o cada 3 semanas (1T3W) o tres administraciones durante 4 semanas (3T4W) para que el paciente reciba dieciséis o doce ciclos de ADC contra AXL a intervalos de tres semanas o cuatro semanas durante por ejemplo, 48 semanas, prolongando, acortando o repitiendo el régimen según lo determine el médico a cargo.

En una realización, la invención se refiere a un método para tratar un NSCLC resistente a erlotinib en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) erlotinib, o un agente terapéuticamente eficaz análogo o derivado del mismo. El erlotinib se puede administrar, por ejemplo, por vía oral a una dosis de 50 a 300 mg, tal como 100-200 mg, tal como aproximadamente 150 mg, una

o dos veces al día, o cada 2 o 3 días. Preferiblemente, el erlotinib se administra una vez al día a una dosis de aproximadamente 150 mg. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL.

En una realización, la invención se refiere a un método para tratar un melanoma resistente a vemurafenib en un sujeto, en donde el melanoma exhibe una mutación en BRAF y proporcionando la mutación la inhibición por vemurafenib de la actividad quinasa BRAF de BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. En una realización, la mutación es una sustitución de aminoácido en el residuo V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib se puede administrar, por ejemplo por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como aproximadamente 1000 mg por día, por ejemplo, 960 mg, administrado como 4 comprimidos x 240 mg cada 12 horas (con un intervalo de aproximadamente 12 horas).

La presente descripción proporciona un método para tratar un melanoma resistente a dabrafenib en un sujeto, en donde el melanoma exhibe una mutación en BRAF y proporcionando la mutación la inhibición por dabrafenib de la actividad quinasa BRAF de BRAF mutante, comprendiendo el método la administración al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. La mutación puede ser una sustitución de aminoácido en el residuo V600, L597 y/o K601. La mutación se puede seleccionar entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib se puede administrar, por ejemplo, por vía oral al sujeto a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como aproximadamente 100-200 mg, tal como aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferiblemente, el dabrafenib se administra como 150 mg por vía oral dos veces al día, por ejemplo, al menos 1 hora antes de una comida o al menos 2 horas después de una comida.

La presente descripción proporciona un método para tratar un melanoma resistente a dabrafenib, trametinib o ambos en un sujeto, en donde el melanoma exhibe una mutación en BRAF y proporcionando la mutación la inhibición por dabrafenib de la actividad quinasa BRAF de BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo y (iii) trametinib o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo. El cáncer puede ser un cáncer que expresa AXL. La mutación puede ser una sustitución de aminoácido en el residuo V600, L597 y/o K601. La mutación se puede seleccionar entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib se puede administrar, por ejemplo, por vía oral al sujeto a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como aproximadamente 100-200 mg, tal como aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferiblemente, el dabrafenib se administra como 150 mg por vía oral dos veces al día, por ejemplo, al menos 1 hora antes de una comida o al menos 2 horas después de una comida. El trametinib se puede administrar, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, como aproximadamente 1 a 4 mg, tal como aproximadamente 2-3 mg, tal como aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

La presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer de cuello uterino resistente a un taxano en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana y (ii) un taxano. En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. Preferiblemente, el taxano es paclitaxel o un análogo terapéuticamente eficaz o derivado del mismo, tal como docetaxel. El paclitaxel se puede administrar por vía intravenosa (iv) al sujeto, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 100-500 mg/m², tal como aproximadamente 125-400 mg/m², tal como aproximadamente 135 mg/m², 175 mg/m² o 250 mg/m² durante unas pocas horas (p. ej., 3 horas), y el tratamiento se repite cada 1, 2, 3, 4, 5 semanas, tal como cada 3 semanas. Alternativamente, el paclitaxel se puede administrar por vía intravenosa como paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel), por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 50-400 mg/m², tal como aproximadamente 75-300 mg/m², tal como aproximadamente 100-200 mg/m², tal como aproximadamente 125 mg/m² durante un período de 30 minutos a 1 hora o más y una vez por semana, y repetir el tratamiento dos veces por semana, o una vez cada 2 o 3 semanas, por ejemplo, una vez por semana. El docetaxel se puede administrar, a su vez, por vía iv a una dosis de aproximadamente 25-500 mg/m², tal como aproximadamente 50-300 mg/m², tal como aproximadamente 75-200 mg/m², tal como aproximadamente 100 mg/m² durante 30 minutos a 2 horas, tal como 1 hora, y el tratamiento se repite cada 1, 2, 3, 4 o 5 semanas, tal como cada 3 semanas.

En particular, el ADC contra AXL se puede utilizar, solo o combinado con el agente terapéutico, para tratar el cáncer recurrente en un sujeto, donde el cáncer reapareció después de un tratamiento inicial con el agente terapéutico. Si el cáncer reaparece una vez más después del tratamiento inicial con ADC contra AXL, el ADC contra AXL se puede utilizar nuevamente, solo o junto con el agente terapéutico, para tratar el cáncer recurrente.

La presente descripción proporciona un método para seleccionar un sujeto que padece un cáncer para el tratamiento con una combinación de un ADC contra AXL y un agente terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico, un TKI, un PI3Ki, un mAb/rTKI y un S/Th KI, que comprende determinar

- (a) si el sujeto cumple los criterios para el tratamiento con un agente quimioterapéutico, TKI, PI3Ki, mAb/rTKI o S/Th KI;
 (b) si la expresión de AXL en el cáncer está asociada con la resistencia al TKI o S/Th KI; y
 (c) seleccionar un sujeto que cumpla los criterios para el tratamiento con el TKI o S/Th KI y que padezca un cáncer para el cual la expresión de AXL está asociada con la resistencia al TKI o S/Th KI. En una realización, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, un TKI o S/Th KI.

La presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto al que se le ha diagnosticado un melanoma que es, o tiene una alta tendencia a volverse, resistente al vemurafenib o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana.

La presente descripción proporciona un método para determinar si un sujeto que padece melanoma es adecuado para el tratamiento con una combinación de (i) vemurafenib o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo y (ii) un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana, en donde el sujeto se somete o ha recibido tratamiento con vemurafenib (o el análogo o derivado), y se determina o se sospecha que es resistente al vemurafenib (o el análogo o derivado), lo que determina que el sujeto es adecuado para el tratamiento. Se puede determinar si el melanoma expresa AXL. En una realización, el análogo es dabrafenib.

La presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto al que se le ha diagnosticado un cáncer cervical que es, o tiene una alta tendencia a volverse, resistente al paclitaxel o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, comprendiendo tal otro taxano (p. ej., docetaxel), administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC que comprende un anticuerpo que se une al AXL humana.

La presente descripción proporciona un método para determinar si un sujeto que padece cáncer cervical es adecuado para el tratamiento con una combinación de (i) paclitaxel o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, tal como otro taxano (por ejemplo, docetaxel) y (ii) un ADC que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana, en donde el sujeto está siendo sometido o se sometió a tratamiento con paclitaxel y se determina o se sospecha que es resistente al paclitaxel, lo que determina que el sujeto es adecuado para el tratamiento. En otro aspecto, se puede determinar si el cáncer de cuello uterino expresa AXL.

Se puede haber determinado que la neoplasia, el tumor o el cáncer resistentes que se deben tratar con un anti-ADC contra AXL expresan AXL.

Esto se puede lograr detectando niveles de antígeno AXL o niveles de células que expresan AXL en su superficie celular en una muestra tomada de un paciente. El paciente puede, por ejemplo, sufrir un cáncer cervical, melanoma o NSCLC. El antígeno AXL que se debe detectar puede ser un antígeno AXL soluble, un antígeno AXL asociado a células o ambos. La muestra que se debe analizar se puede poner en contacto, por ejemplo, con un anticuerpo anti-AXL en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a AXL, opcionalmente junto con una muestra de control y/o anticuerpo de control que se une a un antígeno irrelevante. La unión del anticuerpo a AXL se puede detectar (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 más alto de anticuerpo anti-AXL o complejo de anticuerpo anti-AXL-AXL en la muestra de prueba muestra un mayor nivel de AXL en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control, lo que indica una mayor expresión de AXL. Los ejemplos de inmunoensayos convencionales útiles para tales fines incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia Western y/o inmunoprecipitación.

Se puede tomar una muestra de tejido de un tejido que se sabe o se sospecha que contiene antígeno AXL y/o células que expresan AXL. Por ejemplo, la detección in situ de la expresión de AXL se puede lograr retirando un espécimen histológico, tal como una biopsia tumoral o una muestra de sangre de un paciente, y proporcionando el anticuerpo anti-AXL a tal espécimen después de la preparación adecuada de la muestra. El anticuerpo se puede proporcionar aplicando o superponiendo el anticuerpo al espécimen, que a continuación se detecta utilizando medios adecuados.

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.

El nivel de AXL expresado en las células en una muestra también se puede determinar de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 23, donde la expresión de AXL en la membrana plasmática de las líneas celulares tumorales humanas se cuantificó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando análisis QIFIKIT (DAKO, Núm. de Cat. K0078), utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AXL (aquí: anticuerpo monoclonal de ratón ab89224; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Brevemente, se prepara una suspensión unicelular, y opcionalmente se lava. Las siguientes etapas se realizan sobre hielo. Las células se siembran, por ejemplo, a 100.000 células por pocillo o tubo,

y a continuación se sedimentan y resuspenden en 50 µL de muestra de anticuerpo a una concentración de 10 µg/mL, opcionalmente añadiendo un anticuerpo de control a una muestra paralela. Después de una incubación de 30 minutos a 4°C, las células se sedimentan y se resuspenden en 150 µL de tampón FACS, y la cantidad de AXL se determina mediante análisis FACS utilizando, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con FITC que se une al anti-AXL y los anticuerpos de control. Para cada línea celular, la capacidad de unión de anticuerpos (ABC), una estimación del número de moléculas AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó utilizando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpos contra AXL, basándose en la ecuación de una curva de calibración como se describe en el Ejemplo 23 (interpolación de incógnitas de la curva patrón). Utilizando el método del Ejemplo 23, el nivel de AXL en las células que expresan AXL se puede estimar en al menos 5000, tal como al menos 8000, tal como al menos 13000.

La presencia o el nivel de células que expresan AXL en una neoplasia, tumor o cáncer se puede evaluar mediante generación de imágenes in vivo de anticuerpos anti-AXL marcados de forma detectable de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Una señal significativamente más alta de un sitio, tal como el sitio que se sabe o se sospecha que alberga un tumor, que el fondo u otro control indica expresión en exceso de AXL en el tumor o cáncer.

ADC contra AXL

Los ADC adecuados para su uso en el contexto de la presente invención se pueden preparar a partir de cualquier anticuerpo anti-AXL. Los anticuerpos anti-AXL preferidos se caracterizan por una o más de las propiedades de unión a AXL, secuencias variables o hipervariables, o una combinación de propiedades de unión y secuencia, establecidas en los aspectos y realizaciones a continuación. En particular, el anticuerpo puede ser uno que se une a AXL, pero no compite por la unión de AXL con el ligando 6 Específico de la Detención del Crecimiento (Gas6). Los más preferidos son los anticuerpos anti-AXL específicos cuyas secuencias se describen en la Tabla 4, en particular el anticuerpo denominado 107 y los anticuerpos que comparten una o más propiedades de unión a AXL o secuencias CDR, VH y/o VL con el anticuerpo 107.

Por lo tanto, en una realización concreta de cualquier aspecto o realización anterior, el anticuerpo anti-AXL 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 SEC ID NO: 36, 37, y 38, y la región VL comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40.

El ADC puede comprender tal anticuerpo anti-AXL conectado a un agente citotóxico que es una auristatina o un análogo peptídico funcional o derivado de la misma, tal como, por ejemplo, monometil auristatina E, preferiblemente a través de un conector de maleimidocaproyl-valina-citrulina-p-aminobencilo-carbonilo (mc-vc-PAB).

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 los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno bajo condiciones fisiológicas y/o específicas de tumor típicas con una semivida de periodos de tiempo significativos, tal 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 periodo relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar 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, mediante su unión, con el antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al 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 el documento WO 2007/059782; (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 (Ward *et al.* 1989), que consiste esencialmente en un dominio VH y también se denomina anticuerpo de dominio (Holt *et al.* 2003); (vi) anticuerpos de camélidos o nanoanticuerpos (Revs *et al.* 2005) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante métodos

recombinantes, mediante 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), véase por ejemplo Bird *et al.* (1988) y Huston *et al.* (1988). Tales anticuerpos de cadena sencilla están englobados dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o esté claramente indicado por contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son rasgos únicos 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 conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión al antígeno) proporcionados por medio de cualquier técnica conocida, tal como la escisión enzimática, la síntesis de péptidos y las técnicas recombinantes, y que conservan 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 la cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de la cadena pesada (abreviada aquí 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. Se pretende que el término "inmunoglobulina" como se emplea en la presente memoria se refiera 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 ha sido bien caracterizada (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989))). 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 la cadena ligera (abreviada aquí 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 los bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son 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 (véase Lefranc *et al.* (1999) y Brochet *et al.* (2008)).

El término "región de unión al 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" se pueden utilizar indistintamente, a menos que el contexto lo contradiga, en el ámbito 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, como aproximadamente 10^{-8} M o menos, como aproximadamente 10^{-9} M o menos, alrededor de 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 por la unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad a la cual 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 a la cual 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 la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Dicho valor también se conoce como valor k_{off} o constante 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 la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Dicho valor también se conoce como valor k_{on} o constante 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 denominada 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 de Receptores Tirosina Quinasa (RTK) TAM 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 extracelulares próximos a la membrana tipo III (FNIII), un dominio transmembrana y un dominio quinasa intracelular. AXL se activa al unirse su ligando Gas6, por interacciones homofílicas independientes del ligando entre dominios extracelulares de AXL, por autofosforilación en presencia de especies reactivas de oxígeno (Korshunov *et al.* 2012) o por transactivación a través de EGFR (Meyer *et al.* 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 a 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 epítipos 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 epítipos 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 eficazmente bloqueados o cubiertos 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 Específico 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 compuesto 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 denominarse "ligando de 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 humana y un transgén de cadena ligera, fusionados a una célula inmortalizada.

En el contexto de la presente invención, el término "ADC" se refiere a un producto conjugado de fármaco y anticuerpo, que en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-AXL que está acoplado a un radical terapéutico, p. ej., un radical citotóxico como se describe en la presente solicitud. Este puede estar acoplado, p. ej., con un conector a, p. ej., cisteína o con otros métodos de conjugación a otros aminoácidos. El radical puede p. ej. ser un fármaco o una toxina o similar.

Como se emplea en la presente memoria, un "radical terapéutico" significa un compuesto que ejerce un efecto terapéutico o preventivo cuando se administra a un sujeto, particularmente cuando se administra como un ADC como se describe en la presente memoria. Un radical "citotóxico" o "citostático" es un compuesto que es perjudicial

para (p. ej., destruye) las células. Algunos radicales citotóxicos o citostáticos para su uso en ADC son hidrófobos, lo que significa que no tienen o tienen una solubilidad limitada en agua, por ejemplo, 1 g/L o menos (muy poco soluble), tal como 0,8 g/L o menos, tal como 0,6 g/L o menos, tal como 0,4 g/L o menos, tal como 0,3 g/L o menos, tal como 0,2 g/L o menos, tal como 0,1 g/L o menos (prácticamente insoluble). Los radicales citotóxicos o citostáticos hidrófobos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ciertos inhibidores de microtubulina tales como auristatina y sus derivados, p. ej., MMAF y MMAE, así como maitansina y sus derivados, p. ej., DM1.

El anticuerpo puede tener una afinidad de unión (K_D) en el intervalo de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M a 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, en una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión al antígeno de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M, 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 de 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, correspondiente a los aminoácidos 1-447 de la proteína completa (SEQ ID NO: 130; véase el Ejemplo 1) que se ha expresado de forma recombinante. Debido a la ausencia del dominio transmembrana e intracelular, el dominio extracelular de AXL recombinante no está anclado, p. ej. a una superficie celular y permanece en solución. Es bien conocido cómo expresar una proteína de forma recombinante, véase p. ej. Sambrook (1989), y, por lo tanto, está dentro del conocimiento del experto en la técnica proporcionar tal dominio extracelular de AXL recombinante.

El anticuerpo puede tener una velocidad de disociación de AXL de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, y en donde la velocidad 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, en una realización, el anticuerpo tiene una velocidad de disociación de AXL de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, y en donde la velocidad de disociación se mide por medio de 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 de AXL recombinante por medio de Interferometría de Biocapa en 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 unido 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 a la velocidad a la que el anticuerpo que se une a AXL se disocia del dominio extracelular recombinante de AXL y se expresa como s^{-1} .

Los ADC para su uso de la presente invención pueden comprender una porción de anticuerpo que se une a un dominio extracelular de AXL sin competir o interferir con la unión de Gas6 a AXL. En particular, el anticuerpo se puede unir al dominio Ig1 en el dominio extracelular sin competir o interferir con la unión de Gas6 a AXL. El anticuerpo se puede unir al dominio extracelular y no mostrar más de 20% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar una reducción de no más de 15% de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo puede mostrar una reducción de no más de 10% 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 no muestra más de 2% de reducción de la unión máxima de Gas6 a AXL. El anticuerpo no muestra más de 1% de reducción de la unión máxima de Gas6. El anticuerpo se puede unir al dominio Ig2 en el dominio extracelular de AXL sin competir o interferir con la unión de Gas6 a AXL. El anticuerpo se une al dominio Ig2 en el dominio extracelular de AXL y muestra no más de 20%, tal como no más de 15%, 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 en la unión máxima de Gas6 a AXL. La capacidad para competir o reducir la unión a Gas6 se puede determinar como se describe en el Ejemplo 2 o el Ejemplo 12. El anticuerpo se puede unir al dominio Ig2 en el dominio extracelular de AXL sin competir o interferir con la unión máxima de Gas6 a AXL.

La unión máxima de anticuerpos en presencia de Gas6 puede ser 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 un ensayo de competición, en donde la competición entre dicho anticuerpo que se une a AXL humana y dicho Gas6 se

determina en células A431 preincubadas con Gas6 y sin Gas6.

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 la unión de anti-AXL con unión de Gas6". Por lo tanto, el anticuerpo puede ser uno que no compita por la unión de 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 anticuerpos anti-AXL que se deben probar,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado fluorescentemente 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) añadir Gas6,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado fluorescentemente que detecta Gas6, y
- iv) analizar las células mediante FACS.

El anticuerpo puede modular la señalización asociada a AXL en una célula que expresa AXL cuando la célula se pone en contacto con el anticuerpo.

El anticuerpo puede ser uno que no modula la señalización asociada a AXL en una célula que expresa AXL cuando la célula se pone en contacto con el anticuerpo.

Los ejemplos no limitantes de modulación de la señalización asociada a AXL incluyen la modulación de rutas de señalización intracelular tales como las cascadas PI3K/AKT, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), STAT o NF- κ B.

El anticuerpo anti-AXL o ADC contra AXL puede competir por la unión a AXL con un anticuerpo que comprende una región pesada variable (VH) y una región ligera variable (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: 5 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 6 **[148]**;
- (c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 34 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 35 **[733]**;
- (d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154]**;
- (e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 11 **[171]**;
- (f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183]**;
- (g) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
- (h) una región VH que comprende SEQ ID NO: 31 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726]**;
- (i) una región VH que comprende SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 4 **[140]**;
- (j) una región VH que comprende SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154-M103L]**;
- (k) una región VH que comprende SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 13 **[172]**;
- (l) una región VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 15 **[181]**;
- (m) una región VH que comprende SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;
- (n) una región VH que comprende SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 20 **[187]**;
- (o) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]** ;
- (p) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]** ;
- (q) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]**;
- (r) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**; y
- (s) una región VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726-M101L]**.

Cuando se utiliza en la presente memoria en el contexto de un anticuerpo y un ligando Gas6 o en el contexto de dos o más anticuerpos, el término "compite con" o "compite de manera cruzada con" indica que el anticuerpo compete con el ligando u otro anticuerpo, p. ej., un anticuerpo "de referencia" en la unión a un antígeno, respectivamente. El Ejemplo 2 describe un ejemplo de cómo evaluar la competición de un anticuerpo anti-AXL con el ligando de AXL Gas6. Los anticuerpos de referencia preferidos para la competición cruzada entre dos anticuerpos son aquellos que comprenden una región de unión que comprende la región VH y la región VL de un anticuerpo designado en la presente memoria 107, 148, 733, 154, 171, 183, 613, 726, 140, 154-M103L, 172, 181, 183-N52Q, 187, 608-01, 610-01, 613-08, 620-06 o 726-M101L, como se establece en la Tabla 4. Un anticuerpo de referencia particularmente preferido es el anticuerpo designado 107.

El anticuerpo anti-AXL se puede unir al mismo epítipo sobre AXL que uno cualquiera o más de los anticuerpos de acuerdo con la realización mencionada anteriormente, como se define por sus secuencias VH y VL, p. ej., una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO:2 [107].

Los métodos para determinar un epítipo al que se une un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, el experto en la técnica sabría cómo determinar tal epítipo. Sin embargo, un ejemplo para determinar si un anticuerpo se une dentro de cualquier epítipo descrito en la presente memoria puede ser mediante la introducción de mutaciones puntuales en el dominio extracelular del dominio extracelular de AXL, p. ej., con el propósito de identificar aminoácidos implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica la introducción de mutaciones puntuales en el dominio extracelular de AXL y probar la unión de anticuerpos a dominios extracelulares de AXL mutados puntuales, ya que se espera que el efecto de las mutaciones puntuales en la estructura 3D general sea mínimo.

Se utilizó un método alternativo en el Ejemplo 3, en donde se mapeó la especificidad del dominio AXL preparando un panel de mutantes de AXL quiméricos de humano-ratón donde el dominio Ig2, FN1 o FN2 humano, había sido reemplazado por su análogo murino, y determinando a qué mutante se unía el anticuerpo anti-AXL. Este método se basó en el principio de que estos anticuerpos específicos de AXL humanas reconocieron AXL humana pero no de ratón. Así, en realizaciones separadas y específicas, el anticuerpo se une al dominio de AXL, al dominio Ig2 de AXL, al dominio FN1 de AXL o al dominio FN2 de AXL.

En este ejemplo también se utilizó un método de mapeo de epítopos de más alta resolución, que identifica los aminoácidos del dominio extracelular de AXL implicados en la unión de anticuerpos. Específicamente, este método analizó la unión del anticuerpo anti-AXL a una biblioteca de variantes de secuencia de AXL generadas por recombinación de secuencias de AXL derivadas de especies con niveles variables de homología con la secuencia de AXL humana (SEQ ID NO: 130) en el dominio extracelular. Este método se basó en el principio de que estos anticuerpos humanos específicos de AXL reconocen AXL humana, pero no la AXL de ninguna de las otras especies utilizadas en el ejemplo.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio de AXL, y la unión del anticuerpo puede depender de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o uno o más o todos de T112 a Q124 de AXL humana, en donde la numeración de residuos de aminoácidos se refiere a sus respectivas posiciones en AXL humana (SEQ ID NO: 130). El anticuerpo puede formar un epítipo dentro del dominio de AXL, y la unión del anticuerpo puede depender de los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana. La unión de los anticuerpos puede depender de uno o más o todos los aminoácidos en las posiciones L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 y Q129, correspondientes a los aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo designado en la presente memoria 107. La unión del anticuerpo puede depender de uno o más o todos los aminoácidos en la posición T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 y Q124.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio Ig2 de AXL, y la unión del anticuerpo puede depender de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a la posición D170 o la combinación de D179 o uno o más o todos los aminoácidos en las posiciones T182 a R190 de AXL humana. La unión de anticuerpos puede depender de los aminoácidos en la posición T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 y R190.

El anticuerpo se puede unir al dominio FN1 de AXL humana, y la unión del anticuerpo puede depender de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de AXL humana. La unión de anticuerpos puede depender de los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de AXL humana.

El anticuerpo se puede unir al dominio FN2 de AXL humana y la unión del anticuerpo puede depender de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones A359, R386 y Q436 a K439 de AXL humana.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio Ig1 de AXL, y el epítipo puede comprender o requerir uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o uno o más o todos de T112 a Q124 de AXL humana, en donde la numeración de residuos de aminoácidos se refiere a sus respectivas posiciones en AXL humana (SEQ ID NO: 130). En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio de AXL, y el epítipo comprende o requiere los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana. Preferiblemente, el epítipo comprende uno o más o todos los aminoácidos en la posición L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 y Q129, correspondientes a los aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo designado en la presente memoria 107. El epítipo puede uno o más o todos los aminoácidos en la posición T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 y Q124.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio Ig2 de AXL, y el epítipo puede comprender o requerir uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a la posición D170 o la combinación de D179 o uno o más o

todos los aminoácidos la posición T182 a R190 de AXL humana. El epítipo puede comprender o requerir los aminoácidos en la posición T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 y R190.

5 El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio FN1 de AXL humana, cuyo epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de AXL humana. El epítipo puede comprender o requerir los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de AXL humana.

10 El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio FN2 de AXL humana, cuyo epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones A359, R386 y Q436 a K439 de AXL humana.

El anticuerpo se puede unir a un epítipo dentro del dominio de tipo FN1 de AXL humana.

15 El anticuerpo se puede unir a un epítipo sobre AXL cuyo epítipo es reconocido por cualquiera de los anticuerpos definidos por

- a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107];
- 20 b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, [148];
- 25 c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente [733];
- d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente [154];
- 30 e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente [154-M103L];
- f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente, [171];
- 35 g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 65, GAS, y 66, respectivamente, [172];
- h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 70, GAS, y 71, respectivamente, [181];
- 40 i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, [183];
- 45 j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, [183-N52Q];
- k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 81, AAS, y 82, respectivamente, [187];
- 50 l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 86, GAS, y 87, respectivamente, [608-01];
- 55 m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 91, GAS, y 92, respectivamente, [610-01];
- n) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 96, GAS, y 97, respectivamente, [613];
- 60 o) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 10, DAS, y 102, respectivamente, [613-08];
- p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 106,

GAS, y 107, respectivamente, **[620-06]**;

q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, **[726]**;

r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;

s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 44, AAS, y 45, respectivamente, **[140]**;

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

u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, **[148/140]**;

v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente **[171/172/181]**; y

w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente **[726/187]**; y

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

El anticuerpo se puede unir a un epítipo en AXL cuyo epítipo es reconocido por cualquiera de los anticuerpos definidos por comprender una región de unión que comprende las secuencias VH y VL de un anticuerpo seleccionado entre los designados en la presente memoria 107, 061, 137, 148, 154-M103L, 171, 183-N52Q, 511, 613, 726-M102L y 733. Como se muestra en el Ejemplo 16, estos anticuerpos anti-AXL se internalizan y, por lo tanto, son adecuados para un enfoque de ADC.

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en:

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

(b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, **[148]**;

(c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente **[733]**;

(d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente **[154]**;

(e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente **[154-M103L]**;

(f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente, **[171]**;

(g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 65, GAS, y 66, respectivamente, **[172]**;

(h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 70, GAS, y 71, respectivamente, **[181]**;

(i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;

(j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76,

ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;

(k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 81, AAS, y 82, respectivamente, **[187]**;

(l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 86, GAS, y 87, respectivamente, **[608-01]**;

(m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 91, GAS, y 92, respectivamente, **[610-01]**;

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

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

(p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 106, GAS, y 107, respectivamente, **[620-06]**;

(q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, **[726]**;

(r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;

(s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 44, AAS, y 45, respectivamente, **[140]**;

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

(u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, **[148/140]**;

(v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente **[171/172/181]**; y

(w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente **[726/187]**; y

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

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que 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: 5 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 6 **[148]**;

(c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 34 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 35 **[733]**

(d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154]**;

(e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 11 **[171]**;

(f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183]**;

(g) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;

(h) una región VH que comprende SEQ ID NO: 31 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726]**;

(i) una región VH que comprende SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 4 **[140]**;

(j) una región VH que comprende SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154-M103L]**;

(k) una región VH que comprende SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 13 **[172]**;

(l) una región VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 15 **[181]**;

(m) una región VH que comprende SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;

(n) una región VH que comprende SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 20 **[187]**;

(o) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]**;

(p) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]**;

- (q) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO:28 **[613-08]**;
 (r) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO:30 **[620-06]**; y
 (s) una región VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una región VL que comprende SEQ ID NO:33 **[726-M101L]**.

La presente descripción también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, región VH, o una o más CDR de los anticuerpos mencionados anteriormente. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo contra AXL todavía permite que el anticuerpo conserve 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, tal anticuerpo contra AXL puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

Tales variantes funcionales conservan típicamente una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = Núm. de posiciones idénticas/Núm. total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se deben 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.

La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar, por ejemplo, utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización de apertura de hueco de 10, la penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción no resumida) se utiliza como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del Alineamiento} - \text{Número total de Huecos en el Alineamiento}).$$

Las secuencias de las variantes de VH, VL y/o CDR 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, (por ejemplo, aproximadamente 65-95%, tal como aproximadamente 92%, 93% o 94%) de las sustituciones en la variante son reemplazos de residuos de aminoácidos conservativos.

Las secuencias de las variantes de VH, VL y/o CDR 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 de residuos de aminoácidos conservativos.

También se proporcionan realizaciones de la presente descripción en las que se permiten mutaciones o sustituciones de hasta cinco mutaciones o sustituciones a través de las tres secuencias CDR en la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable de la realización anterior. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a través de las tres secuencias CDR de la cadena pesada variable y las tres secuencias CDR de la cadena ligera variable. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a través de las seis secuencias CDR de la región de unión. 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 más de 10%. Los aminoácidos conservativos, físicos o funcionales se seleccionan 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.

Por lo tanto, el anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en secuencias VH y VL al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99% idénticas a:

- (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: 5 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 6 **[148]**;
 (c) una región VH que comprende SEQ ID NO: 34 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 35 **[733]**;
 (d) una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154]**;
 (e) una región VH que comprende SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 11 **[171]**;
 (f) una región VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183]**;

- (g) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]** ;
- (h) una región VH que comprende SEQ ID NO: 31 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726]** ;
- (i) una región VH que comprende SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 4 **[140]**;
- (j) una región VH que comprende SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154-M103L]**;
- (k) una región VH que comprende SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 13 **[172]**;
- (l) una región VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 15 **[181]**;
- (m) una región VH que comprende SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;
- (n) una región VH que comprende SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 20 **[187]** ;
- (o) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]** ;
- (p) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]** ;
- (q) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]** ;
- (r) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**; y
- (s) una región VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726-M101L]**.

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 conserve 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, tal anticuerpo contra AXL puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

Tales variantes funcionales conservan típicamente una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = Núm. de posiciones idénticas/Núm. total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se deben introducir para una alineación óptima 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.

Las secuencias de las variantes de VH, VL y/o CDR 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.

Las secuencias de las variantes de VH, VL y/o CDR 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 de residuos de aminoácidos conservativos.

También se proporcionan realizaciones de la presente descripción en las que se permiten mutaciones o sustituciones de hasta cinco mutaciones o sustituciones a través de las tres secuencias CDR en la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable de la realización precedente. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones se pueden distribuir a través de las tres secuencias CDR de la cadena pesada variable y las tres secuencias CDR de la cadena ligera variable. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones pueden distribuirse a través de las seis secuencias CDR de la región de unión. 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 del 30%, tal como más de 20% o más de 10%. Los aminoácidos conservativos, físicos o funcionales se seleccionan entre los 20 aminoácidos naturales encontrados, es decir, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gin, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val.

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionadas del grupo que consiste en secuencias VH y VL al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99% idénticas a:

- (t) una región VH que comprende SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 2 **[107]**;
- (u) una región VH que comprende SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 6 **[148]**;
- (v) una región VH que comprende SEQ ID NO: 34 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 35 **[733]**;
- (w) una región VH que comprende SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154]**;
- (x) una región VH que comprende SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 11 **[171]**;
- (y) una región VH que comprende SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183]**;

- (z) una región VH que comprende SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 26 **[613]**;
 (aa) una región VH que comprende SEQ ID NO: 31 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726]**;
 (bb) una región VH que comprende SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 4 **[140]**;
 (cc) una región VH que comprende SEQ ID NO: 8 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 9 **[154-M103L]**;
 (dd) una región VH que comprende SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 13 **[172]**;
 (ee) una región VH que comprende SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 15 **[181]**;
 (ff) una región VH que comprende SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;
 (gg) una región VH que comprende SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 20 **[187]**;
 (hh) una región VH que comprende SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 22 **[608-01]**;
 (ii) una región VH que comprende SEQ ID NO: 23 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 24 **[610-01]**;
 (jj) una región VH que comprende SEQ ID NO: 27 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 28 **[613-08]**;
 (kk) una región VH que comprende SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 30 **[620-06]**;
 y
 (ll) una región VH que comprende SEQ ID NO: 32 y una región VL que comprende SEQ ID NO: 33 **[726-M101L]**.

El anticuerpo puede comprender al menos una región de unión que comprende las secuencias VH y VL CDR1, CDR2, y CDR3 de un anticuerpo anti-AXL conocido en la técnica, p. ej., un anticuerpo descrito en cualquiera de Leconet *et al.* (2013), Li *et al.* (2009), Ye *et al.* (2010), lida *et al.* (2014), documento WO 2012/175691 (INSERM), documento WO 2012/175692 (INSERM), documento WO 2013/064685 (Pierre Fabré Medicaments), documento WO 2013/090776 (INSERM), documento WO 2009/063965 (Chugai Pharmaceuticals), documento WO 2010/131733, documento WO 2011/159980 (Genentech), documento WO09062690 (U3 Pharma), documento WO2010130751 (U3 Pharma), documento WO2014093707 (Stanford university) y documento EP2228392A1 (Chugai). El anticuerpo puede ser un anticuerpo murino 1613F12 o una variante quimérica o humanizada del mismo como se describe en el documento WO2014174111 (Pierre Fabré Medicament), en donde las secuencias VH y VL del anticuerpo de ratón 1613F12 se presentan como SEQ ID: 8 y SEQ ID: 7, respectivamente. La secuencia VH de la variante de anticuerpo humanizado de 1613F12 se selecciona entre las secuencias descritas allí como SEQ ID NO: 29 a 49 y SEQ ID NO: 82, y la secuencia VL de la variante de anticuerpo humanizado de 1613F12 se selecciona entre las secuencias descritas allí como SEQ ID NO: 17 a 28 y SEQ ID: 81. Un anticuerpo específico comprende las secuencias VH y VL descritas allí como SEQ ID NO: 29 y 17, respectivamente. Las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de VH de 1613F12 de ratón, quiméricas y humanizadas son SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de VL de 1613F12 de ratón y humanizadas se describen como SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. El anticuerpo puede ser un anticuerpo descrito en el documento WO2011159980 (Hoffman-La Roche), particularmente los párrafos (a páginas 28-52). Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender las regiones hipervariables (HVR) de VH y VL, o las regiones VH y VL, del anticuerpo YW327.6S2, que se describen allí como SEQ ID NO: 7, 8 y 9 (HVR1, 2 y 3 de VH, respectivamente), SEQ ID NO: 10, 11 y 12 (HVR1, 2 y 3 de VL, respectivamente) y SEQ ID NO: 103 y 104 (secuencias VH y VL, respectivamente).

El anticuerpo puede mediar el entrecruzamiento o la formación de cúmulos mediada por anticuerpos (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, lo que puede conducir a la apoptosis de la célula.

El anticuerpo puede inducir una respuesta celular dependiente de Fc tal como ADCC o ADCP contra una célula que expresa AXL después de la unión del anticuerpo específico de AXL a la membrana plasmática de la célula que expresa AXL en presencia de células efectoras. La porción de anticuerpo del anticuerpo es típicamente completa y de un isotipo que conduce a una respuesta ADCC o ADCP, tal como, p. ej., un isotipo IgG1,k.

El anticuerpo puede inducir una respuesta CDC contra una célula que expresa AXL después de la unión del anticuerpo específico de AXL a la membrana plasmática de la célula que expresa AXL en presencia de proteínas del complemento, tales como proteínas del complemento presentes en el suero humano normal, que pueden ser activadas. El anticuerpo es típicamente completo y de un isotipo capaz de inducir la activación del sistema del complemento, tal como, p. ej., un isotipo IgG1,k.

El anticuerpo y/o el ADC se pueden caracterizar adicionalmente mediante internalización tras la unión a AXL. En consecuencia, el anticuerpo y/o ADC pueden ser internalizados y objeto de tráfico a los lisosomas para su escisión proteolítica específica (es decir conector escindible) o no específica (conector no escindible) del complejo anticuerpo anti-AXL-conector-fármaco.

El anticuerpo puede interferir con la regulación mediada por AXL de la respuesta inmunitaria innata o adaptativa, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo a macrófagos, células dendríticas o células NK que expresan AXL.

El radical terapéutico del ADC puede estar conectado al radical de anticuerpo a través de un conector que permite la

liberación del fármaco una vez que el ADC se internaliza, p. ej., por un cambio en el pH o condiciones reductoras. La tecnología de conectores adecuada se conoce en la técnica, como se describe en la presente memoria.

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

10 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 cualquier alotipo de las mismas, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. Adicionalmente, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

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

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

20 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 la 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 las secuencias de cadena pesada y ligera completas en sistemas de expresión adecuados. Se encuentra en el conocimiento del experto en la técnica 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 de acuerdo con la presente invención.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano.

30 Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, incluya 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 descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones, inserciones o deleciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de 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 se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie no humana, por ejemplo, de ratón, en secuencias marco humanas.

40 Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo humano se "obtiene a partir de" una secuencia de 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 tienen una secuencia de aminoácidos que es 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, aparte de la CDR3 de cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia concreta de 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 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

50 El anticuerpo según la presente descripción puede comprender modificaciones de aminoácidos en las cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina. En particular, los aminoácidos en la región Fc del anticuerpo se pueden modificar.

55 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- al 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 células efectoras) y los componentes del sistema del complemento.

60 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 *et al.* (1991). Sin embargo, la región de la bisagra también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

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 establecen Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH1 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

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 establecen Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

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 establecen Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo que carece de la función efectora, un anticuerpo IgG4 estabilizado o un anticuerpo monovalente.

En una realización concreta, la cadena pesada se ha modificado de modo que se ha eliminado toda la región bisagra.

La secuencia del anticuerpo se puede haber modificado de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla.

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 descrita en la presente memoria, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferentes que 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 se unen a al menos dos, tal como al menos tres, antígenos diferentes o al menos dos, tal como al menos tres, epítopos diferentes sobre el mismo antígeno.

La presente descripción se refiere al uso de un ADC que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones descritos en la presente memoria, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferentes que la primera región de unión.

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.

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 sobre la misma diana o sobre dianas diferentes. Si los epítopos están sobre dianas diferentes, tales dianas pueden estar sobre la misma célula o sobre diferentes células, tipos de células o estructuras, tales como tejido extracelular.

El término "diana diferente" como se emplea en la presente memoria, se refiere a otra proteína, molécula o similar a AXL o 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 única que tiene especificidad para dos epítopos diferentes, p. ej., a través de dos scFv unidos en tándem por un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-IgTM), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu *et al.* 2010); (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, 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, p. ej., dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

El anticuerpo biespecífico de la presente descripción 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 controlado del brazo Fab (tal como se describe en el documento WO 2011/131746, Genmab A/S).

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de direccionamiento dual similares a 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 se fusionan moléculas Fv de cadena sencilla o diacuerpos estabilizados con dominios constantes de cadena pesada, regiones de 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 basados en ScFv y diacuerpos y anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej. anticuerpos de dominio, Nanobodies®) se fusionan entre sí o con otra proteína o molécula transportadora fusionada con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos.

Los ejemplos de moléculas similares a IgG con dominios complementarios CH3 incluyen, entre otros, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, documento WO/2002/020039), Botones en Ojales “Knobs-into-Holes” (Genentech, documento WO9850431), CrossMabs (Roche, documento WO 2009/080251, documento WO 2009/080252, documento WO 2009/080253), moléculas heterodiméricas Fc emparejadas electrostáticamente (Amgen, documento EP1870459 y documento WO2009089004; Chugai US201000155133; Oncomed, documento WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body, PIG-body y TIG-body (Pharmabccine), anticuerpo de Dominio Modificado por Intercambio de Cadenas (SEEDbody) (EMD Serono, documento WO2007110205), IgG1 e IgG2 Biespecíficas (Pfizer/Rinat, documento WO11143545), plataforma Azymetric (Zymeworks/Merck, documento WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, documento WO2011028952), XmAb (Xencor), anticuerpos biespecíficos bivalentes (Roche, documento WO2009/080254), IgG biespecífica (Eli Lilly), moléculas DuoBody® (Genmab A/S, documento WO 2011/131746), DuetMab (Medimmune, US2014/0348839), Biclomics (Merus, documento WO 2013/157953), NovImmune (κλBodies, documento WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, documento WO 2010/151792), (DT)-Ig (GSK/Domantis), Anticuerpos dos en uno o Fab de doble acción (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, documento WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), Dominio Variable Dual (DVD)-IgTM (Abbott, documento US 7.612.18), anticuerpos de doble cabeza de doble dominio (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusiones scFv (Genentech/Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246), TvAb (Roche, documento WO2012025525, documento WO2012025530), Fusiones ScFv/Fc, SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergent), Tecnología de Redireccionamiento de Afinidad Dual (Fc-DARTTM) (MacroGenics, documento WO2008/157379, documento WO2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diacuerpo (Imclone/Eli Lilly) y mAb entrecruzados químicamente (Karmanos Cancer Center), y mAb fusionados covalentemente (AIMM therapeutics).

Los ejemplos de moléculas de direccionamiento dual similares a 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 documento WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), enfoques con una cadena ligera común (Crucell/Merus, documento US 7.262.028), κλBodies (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, pero no se limitan a, Dual Variable Domain (DVD)-Ig™ (Abbott, documento US 7.612.181), Anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), Biespecífico tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, documento US 7.951.918), fusión scFv (Novartis), fusión scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) y TvAb (Roche, documento WO2012025525, documento WO2012025530).

Los ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, pero no se limitan a, Fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Tecnología de Redireccionamiento de Afinidad Dual (Fc-DART™) (MacroGenics, documento WO2008157379 y documento WO2010080538) 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 (Biotechnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

Los ejemplos de anticuerpos basados en ScFv, 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 de Afinidad Dual (DART) (MacroGenics), Diacuerpo de Cadena Sencilla (Academic), Anticuerpos de tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), Fusión 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 para su uso como un ADC de acuerdo con la presente descripción introduciendo modificaciones en la región constante del anticuerpo.

El anticuerpo biespecífico puede comprender una primera y una segunda cadenas pesadas, cada una de la primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en la primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondiente 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 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 la primera y la segunda cadenas pesadas no están sustituidas en las mismas posiciones.

El anticuerpo puede ser uno, 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.

El anticuerpo puede ser uno, 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.

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

Por lo tanto, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana puede ser R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana puede ser L en la segunda cadena pesada.

A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran aquí de acuerdo con el índice de numeración Eu (descrito por Kabat, 1991). Los términos "índice de numeración Eu" y "numeración Eu según lo establecido por 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 aquel 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 la 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 de acuerdo con la presente invención.

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

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

En el contexto de la presente descripción, el aminoácido se puede definir por 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 propiedades físicas y funcionales alternativas. Por lo tanto, las clases de aminoácidos se pueden reflejar en una o ambas de las siguientes listas:

Residuo de aminoácidos 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 al 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

- 5 En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como: aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;
En referencia a la nomenclatura bien reconocida para aminoácidos, se utiliza el código de tres letras o un 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 naturales. El término "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.
- 10
- 15 La sustitución de un aminoácido en una posición dada por cualquier otro aminoácido se denomina: Posición original de aminoácido; o p. ej. "K409"
Para una modificación en la que el aminoácido o los aminoácidos originales y/o el aminoácido o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, el más de un aminoácido puede estar separado por "," o "/". Por ejemplo, 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".
- 20
- Tal denominación se puede utilizar indistintamente en el contexto de la invención, pero tiene el mismo significado y propósito.
- 25
- Además, el término "una sustitución" abarca una sustitución en uno cualquiera o en los otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como los 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 denominación 409X, en donde la X designa cualquier aminoácido que no sea el aminoácido original. Estas sustituciones también se pueden denominar 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 aquí cualquiera de tales sustituciones.
- 30
- El anticuerpo según la descripción también puede comprender una delección de un residuo de aminoácido. Tal delección se puede indicar como "del" e incluye, p. ej., la notación K409del. Por lo tanto, en tales realizaciones, la Lisina en la posición 409 se ha suprimido de la secuencia de aminoácidos.
- 35

Tanto la primera como la segunda región de unión del anticuerpo biespecífico se pueden unir 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 regiones de unión, y una primera y una segunda cadenas pesadas, 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 SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 47, y 48, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, [148];
- b) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente, y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente [733];
- c) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 41, 42, y 43, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 44, AAS, y 45, respectivamente, [140];
- d) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52, y 55, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente. [154];
- e) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52, y 54, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente. [154-M103L];
- f) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 57, 58, y 59, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente, [171];
- g) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 62, 63, y 64, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 65, GAS, y 66, respectivamente, [172];
- h) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 67, 68, y 69, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 70, GAS, y 71, respectivamente, [181];
- i) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 73, y 75, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, [183];
- j) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 74, y 75, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, [183-N52Q];
- k) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 78, 79, y 80, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 81, AAS, y 82, respectivamente, [187];
- l) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, [107]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1,

[620-06];

xx) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente, [733]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109, y 110, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, [726]; e

yy) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente, [733]; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109, y 111, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente, [726-M101L];

Los anticuerpos conjugados con un agente citotóxico, fármaco o similar también se conocen como productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Un ADC puede tener una semivida de períodos de tiempo suficiente para que el producto conjugado de anticuerpo-fármaco sea internalizado, degradado e induzca la destrucción de la célula por la toxina liberada.

Por lo tanto, un ADC puede comprender un anticuerpo anti-AXL o un anticuerpo biespecífico y un radical terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico o similares. El agente citotóxico, el fármaco quimioterapéutico o similares 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 conjugan 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 moléculas tales como el ADC contra AXL son engullidas por la membrana celular y arrastradas hacia el interior de la célula. También se puede denominar "endocitosis".

Por consiguiente, en algunos casos se puede desear utilizar anticuerpos que experimentan internalización. Tales anticuerpos que tienen buenas propiedades de internalización pueden ser adecuados para su 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 suministrar 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 diana o en el microentorno tumoral. Los ejemplos incluyen conectores que se escinden por condiciones ácidas, condiciones reductoras o proteasas específicas.

La estabilidad del anticuerpo-conector-fármaco en circulación es importante porque esto 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 conectores escindibles por proteasas son generalmente más estables en circulación que los enlaces disulfuro e hidrazona, aunque la estabilidad de los dos últimos conectores se puede ajustar alterando la estructura química adyacente (Alley *et al.* 2010).

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. Entre los agentes citotóxicos adecuados para formar ADC para su uso en la presente invención se incluyen taxol, tubulisin, duostatina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina, maitansina o un análogo o derivado de los mismos, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina; caliqueamicina o análogos o derivados de los mismos; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descarrizina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, 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), indolinobenzodiazepina (IGN) o análogos de los mismos, antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina,

idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), agentes antimitóticos (p. ej., agentes dirigidos a la tubulina), tales como la toxina de la difteria 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 la cadena A de la ricina desglicosilada), toxina del cólera, una toxina tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modicina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas dantinas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP -S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcína, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxina 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, *California. 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 para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe en otra parte en la presente memoria, tales como, p. ej., citocinas o quimocinas anticancerosas, también son candidatos para radicales terapéuticos útiles para su conjugación con un anticuerpo para su uso según 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 Goodman *et al.* (1990). Por ejemplo, Vitetta *et al.* (1993) y el documento US 5.194.594 proporcionan técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpos.

En una realización, el agente citotóxico se conecta 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 de conector adicional entre el agente citotóxico y el conector primario, es decir el sitio que une la combinación de conector-fármaco al anticuerpo. El motivo de 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). En una realización específica, el conector peptídico escindible 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 conjugaba y las estabildades en suero de los productos conjugados son típicamente altas.

En otra realización, el agente citotóxico se conecta 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 de anticuerpo-conector-fármaco completo se degrada en el compartimento lisosómico. Los ejemplos de un conector no escindible son los tioéteres. La unidad conectora puede no ser escindible y el fármaco se puede liberar por degradación del anticuerpo (véase el documento US 2005/0238649). 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 15%, más típicamente no más de 10% aproximadamente, y aún 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 de producto conjugado de fármaco y anticuerpo, se escinde cuando el compuesto de producto conjugado de fármaco y anticuerpo 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 de producto conjugado de fármaco y anticuerpo durante un período de tiempo predeterminado (p. ej. 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y a continuación cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En una realización, el agente citotóxico se selecciona del grupo: agentes que se dirigen al ADN, p. ej. alquilantes y agentes de entrecruzamiento 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)-matansina (DM1) y tubulisina; y análogos de nucleósidos; o análogos, derivados o profármacos de los mismos.

En una realización, el ADC contra AXL comprende una combinación de;

- 10 i) un conector escindible y un agente citotóxico que tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
- ii) un conector escindible y un agente citotóxico que no tiene la capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
- iii) un conector no escindible y un agente citotóxico que tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad; o
- 15 iv) un conector no escindible y un agente citotóxico que no tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad.

El término "efecto de destrucción por efecto de vecindad", "destrucción por efecto de vecindad", "capacidad de 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 muerte de las células vecinas. Cuando el agente citotóxico se conjuga con un conector escindible o no escindible, 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 que atraviesan 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 conector escindible o 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 adyacentes 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 al 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 los conectores tanto escindibles como no escindibles son seguros en ensayos preclínicos y clínicos.

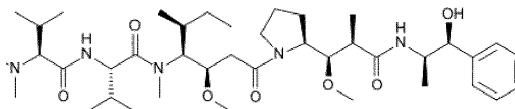
El agente citotóxico se puede elegir del grupo de agentes dirigidos a microtúbulos, tales como auristatinas y maitansinoides.

El término "agente dirigidos 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 de manera crítica 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 desorganizan 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 pueden obtener a partir de p. ej. sustancias naturales tales como los alcaloides vegetales, y evitan que las células sufran 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. Los ejemplos de agentes dirigidos a los microtúbulos son paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, duostatina, auristatinas, maitansinoides, tubulisinas y dolastatina.

El agente citotóxico es auristatina o análogos y derivados de péptidos de auristatina (documento US 5.635.483; documento US 5.780.588). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* 2001) y tiene actividad anticancerosa (documento US 5.663.149) y antifúngica (Pettit, 1998). El radical de fármaco auristatina se puede unir al anticuerpo a través de un conector, a través del extremo N terminal (amino) o el extremo C (terminal) del radical del fármaco peptídico.

Las realizaciones ilustrativas de auristatina incluyen los radicales de fármaco monometil auristatina conectados al extremo N terminal D_E y D_F, descritos por Senter *et al.* (2004) y descritos en el documento US 2005/0238649.

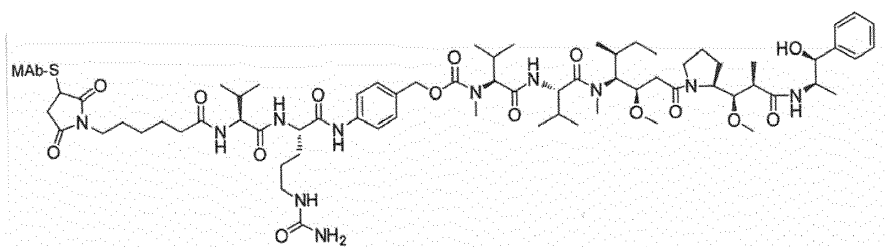
El agente citotóxico puede ser en particular monometil auristatina E (MMAE);



en donde el anticuerpo está conectado a MMAE en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura química anterior por medio del conector apropiado.

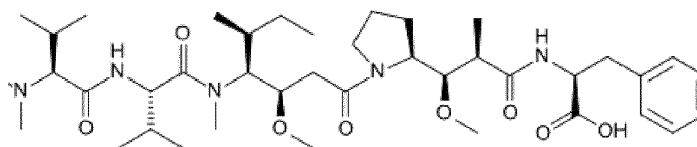
El agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) se puede conectar al anticuerpo a través de un conector de valina-citrulina (VC).

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;



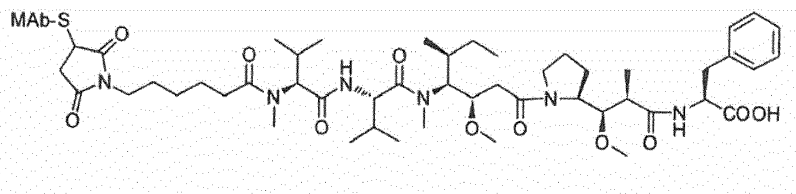
en donde Mab es el anticuerpo.

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



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

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



en donde Mab es el anticuerpo.

El agente citotóxico puede ser duostatina3.

El agente citotóxico puede ser un agente dirigido al ADN.

El término "agente dirigido al 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 dicho agente que actúa con el ADN son los agentes IGN que comprenden dímeros de 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 de unión a surcos menores de ADN sintético de molécula pequeña. Estos compuestos son adecuados para atacar tumores sólidos, así como tumores hematológicos.

El ADC contra AXL comprende de dos a cuatro moléculas citotóxicas por anticuerpo. Dependiendo de las propiedades químicas de la toxina y la combinación 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 citotóxico está representada por p y es el número promedio de radicales de agente citotóxico por anticuerpo en una molécula (también denominada razón fármaco/anticuerpo, DAR). La carga del agente citotóxico puede variar de 1 a 20 radicales de fármaco por anticuerpo y puede ocurrir en aminoácidos con grupos funcionales útiles tales como, pero sin limitación, grupos amino o sulfhidrilo, como en la lisina o la cisteína.

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.

El ADC contra AXL puede comprender de cuatro a ocho moléculas citotóxicas por anticuerpo. El ADC contra AXL puede comprender de seis a diez moléculas citotóxicas por anticuerpo. El ADC contra AXL puede comprender de 10 a 30, tal como de 15 a 25, tal como 20, moléculas citotóxicas por anticuerpo.

Dependiendo de la forma de conjugación, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo, por ejemplo, donde la unión es un tiol de cisteína o una lisina. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que pueden estar conectados a un radical de fármaco ya que la mayoría de los residuos tiol de cisteína en los anticuerpos existen en forma de puentes disulfuro. Por lo tanto, cuando el agente citotóxico se conjuga a través de un tiol de cisteína, el anticuerpo se puede reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. 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 la unión disulfuro intracatenaria).

El radical conector del fármaco puede ser vcMMAE. El radical conector de fármaco vcMMAE y los métodos de conjugación se describen en el documento WO 2004/010957; el documento US 7.659.241; el documento US 7.829.531; y el documento US 7.851.437 (Genética de Seattle). 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, p. ej., como se describe en el Ejemplo 8.

El radical conector del fármaco puede ser mcMMAF. El radical conector de fármacos mcMMAF y los métodos de conjugación se describen en el documento US 7.498.298; el documento US 7.994.135 y el documento WO 2005/081711 (Seattle Genetics), 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.

El agente citotóxico puede estar conectado a 1 o 2 lisinas dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante la conjugación K-Lock™ como se describe en el documento WO 2013/173391, el documento WO 2013/173392 y el documento WO 2013/173393 (Concortis Biosystems). La Duostatina3 (también conocida como Duo3) también se puede unir a los anticuerpos anti-AXL en los residuos de lisina utilizando un método similar a los allí descritos.

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

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

En una realización concreta, el conector es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE. Alternativamente, el conector es SSP y el agente citotóxico es 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.

El conector puede ser el conector escindible AV1-K lock y el agente citotóxico puede ser duostatina3.

El ADC contra AXL puede comprender el conector mc-vc-PAB, el agente citotóxico MMAE y un anticuerpo en el que la al menos una región de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en;

En una realización, el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (y) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO:39, GAS, y 40, respectivamente, **[107]**;
- (z) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, **[148]**;
- 10 (aa) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 114, 115, y 116, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 117, DAS, y 118, respectivamente **[733]**;
- (bb) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente **[154]**;
- 15 (cc) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 55, GAS, y 56, respectivamente **[154-M103L]**;
- (dd) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO:60, GAS, y 61, respectivamente, **[171]**;
- (ee) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 65, GAS, y 66, respectivamente, **[172]**;
- 25 (ff) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 70, GAS, y 71, respectivamente, **[181]**;
- (gg) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;
- 30 (hh) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;
- (ii) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 81, AAS, y 82, respectivamente, **[187]**;
- 35 (jj) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 86, GAS, y 87, respectivamente, **[608-01]**;
- (kk) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 91, GAS, y 92, respectivamente, **[610-01]**;
- 40 (ll) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 96, GAS, y 97, respectivamente, **[613]**;
- (mm) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 101, DAS, y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- 45 (nn) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 106, GAS, y 107, respectivamente, **[620-06]**;
- (oo) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO:112, AAS, y 113, respectivamente, **[726]**;
- 55 (pp) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO:112, AAS, y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;
- (qq) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO:44, AAS, y 45, respectivamente, **[140]**;
- 60 (rr) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613/613-08]**;
- (ss) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 46, 119 y 120,

respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 49, AAS, y 50, respectivamente, [148/140];

(tt) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 60, GAS, y 61, respectivamente [171/172/181]; y

(uu) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 112, AAS, y 113, respectivamente [726/187]; y

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

Un producto conjugado de anticuerpo anti-AXL y fármaco 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 inhibitoria de ARN (p. ej., una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulador (p. ej., una molécula de ADN inmunoestimuladora que contiene el motivo CpG).

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

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 (véase, por ejemplo, Junghans *et al.* (1996); documento US 4.681.581; documento US 4.735.210; documento US 5.101.827; documento US 5.102.990; documento US 5.648.471; y documento US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo halógeno se puede conjugar mediante un método con 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}Bi , ^{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 ejemplos de polímeros y métodos para anclarlos a péptidos se ilustran, por ejemplo, en el documento US 4.766.106; el documento US 4.179.337; el documento US 4.495.285 y el documento US 4.609.546. 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 con la molécula o moléculas conjugadas, tales como las descritas anteriormente, incluidos los métodos descritos por Hunter *et al.* (1974) Pain *et al.* (1981) y Nygren (1982). 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, p. ej., Kanemitsu, 1994). Tales derivados de anticuerpos conjugados también se pueden generar mediante conjugación en residuos internos o azúcares, o aminoácidos no naturales o aminoácidos adicionales que se han introducido en el dominio constante del anticuerpo, cuando sea apropiado.

Los agentes se pueden acoplar directa o indirectamente a un anticuerpo anti-AXL. 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, a una molécula de profármaco que se puede activar *in vivo* con una droga terapéutica. 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. Los ejemplos de tales tecnologías de profármacos y conectores se describen en el documento WO 2002/083180, el documento WO 2004/043493, el documento WO 2007/018431, el documento WO 2007/089149, el documento WO 2009/017394 y el documento WO 2010/62171 (Syngenta BV). También se puede encontrar tecnología adecuada de anticuerpo-profármaco y análogos de duocarmicina en el documento US 6.989.452 (Medarex).

El anticuerpo anti-AXL se puede anclar a un conector quelante, p. ej. tiuxetán, que permite que el anticuerpo se

conjugue con un radioisótopo.

Combinaciones, composiciones y kits

5 El ADC contra AXL para su uso de acuerdo con la presente descripción se puede administrar en forma de una composición. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende el ADC contra AXL y un portador farmacéutico.

10 El ADC contra AXL o la composición farmacéutica que comprende el ADC contra AXL se pueden utilizar para tratar una neoplasia combinados con al menos un agente terapéutico con el que se está tratando o se ha tratado la neoplasia, es decir, el agente quimioterapéutico, el inhibidor de tirosina quinasa, el inhibidor de PI3K, el inhibidor de mAb/rTKI y/o serina/treonina quinasa de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico, un TKI o un S/Th TKI de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior. Típicamente, el ADC contra AXL y el agente terapéutico se administran por separado.

15 La composición farmacéutica que comprende el ADC contra AXL puede comprender adicionalmente el al menos un agente terapéutico con el que se está tratando o se ha tratado la neoplasia, es decir, el agente quimioterapéutico, el inhibidor de tirosina quinasa, el inhibidor de PI3K, el inhibidor de mAb/rTKI y/o serina/treonina quinasa de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico, un TKI o un S/Th TKI de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior. Los ADC contra AXL para su uso de acuerdo con la presente invención combinados con al menos un agente terapéutico también se pueden proporcionar en forma de kit, para administración simultánea, separada o secuencial, en donde el kit puede comprender adicionalmente instrucciones de uso. El ADC y el al menos un agente terapéutico se formulan típicamente como composiciones farmacéuticas separadas.

25 El inhibidor de tirosina quinasa en la combinación, composición o kit puede ser un antagonista de EGFR.

30 El inhibidor de tirosina quinasa en la combinación, composición o kit se puede seleccionar del grupo que consiste en erlotinib, gefitinib, lapatinib, imatinib, sunitinib, crizotinib, midostaurina (PKC412) y quizartinib (AC220), tal como, por ejemplo, erlotinib o un análogo o derivado del mismo tal como lapatinib, gefitinib o. Preferiblemente, el inhibidor de tirosina quinasa es erlotinib.

35 El inhibidor de serina/treonina quinasa en la combinación, composición o kit se puede seleccionar entre vemurafenib, dabrafenib, selumetinib (AZD6244), VTX11E, trametinib y PLX4720.

El inhibidor de BRAF en la combinación, composición o kit puede dar vemurafenib (PLX4032) o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, tal como dabrafenib o PLX4720. El inhibidor de BRAF puede ser vemurafenib. En una realización, el inhibidor de BRAF puede ser dabrafenib.

40 El inhibidor de serina/treonina quinasa en la combinación, composición o kit puede comprender al menos un inhibidor de BRAF y al menos un inhibidor de MEK, en donde el al menos un inhibidor de BRAF se selecciona entre vemurafenib, dabrafenib y una combinación de los mismos, y en donde el inhibidor de MEK se selecciona entre selumetinib (AZD6244) y trametinib, y una combinación de los mismos. Por ejemplo, la combinación, composición o kit puede comprender dabrafenib y trametinib; vemurafenib y trametinib; dabrafenib, vemurafenib y trametinib; dabrafenib y selumetinib; o vemurafenib y selumetinib.

El al menos un agente quimioterapéutico en la combinación, composición o kit puede ser un taxano, por ejemplo, seleccionado entre paclitaxel y docetaxel.

50 El al menos un agente quimioterapéutico en la combinación, composición o kit se puede seleccionar del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido y metformina.

El inhibidor de PI3K en la combinación, composición o kit puede ser alpelisib (BYL719).

55 El mAb/rTKI en la combinación, composición o kit puede ser Cetuximab o MAB391.

60 Los kits pueden incluir, además, si se desea, uno o más de varios componentes de kit farmacéutico convencionales, tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También se pueden incluir en el kit instrucciones impresas, ya sea como prospectos o como etiquetas, que indican las cantidades de los componentes que se deben administrar, las pautas para la administración y/o las pautas para mezclar los componentes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las

descritas por Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995).

- Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido, deberían ser adecuados para el ADC contra AXL y el modo de administración elegido. La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la carencia de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegida (p. ej., menos de un impacto sustancial (10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición relativa, etc.) sobre la unión al antígeno).
- Una composición farmacéutica 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.
- Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas 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 ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se emplea, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados combinados con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- 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 seleccionadas por los expertos en la técnica.
- La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral.
- 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, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.
- La composición farmacéutica se puede administrar por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.
- 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, que sean fisiológicamente compatibles con un ADC contra AXL o agente terapéutico para el uso de acuerdo con la presente invención.
- Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas 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 cacahuate, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o varios tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.
- 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.
- 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 dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.
- Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto 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 etilendiaminetetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

- 5 Las composiciones farmacéuticas 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 también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la vía 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 ADC contra AXL o agentes terapéuticos para los usos 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 etilvinilacetato, 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, Robinson: Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978).

- 20 Los compuestos se pueden formular para garantizar 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. Otros compuestos activos o terapéuticos también se pueden incorporar a las composiciones.

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 portador 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 aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la 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 mediante 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. p. ej. de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado mediante deshidratación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada 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 para su esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en 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 métodos de preparación son el secado al vacío y el secado mediante deshidratación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

Producción de anticuerpos anti-AXL

Los anticuerpos para su uso como ADC de acuerdo con la invención se pueden preparar de forma recombinante en una célula anfitriona, utilizando construcciones de ácido nucleico, típicamente en forma de uno o más vectores de expresión. En una realización, la construcción de ácido nucleico codifica una o más secuencias establecidas en la Tabla 1. En una realización adicional, el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, p. ej. un anticuerpo monoclonal IgG1, κ humano.

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, antes de su conjugación.

El vector de expresión 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 la 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). Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-AXL puede estar comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como describen, por ejemplo, Sykes y Johnson (1997), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe por ejemplo en el documento US 6.077.835 y/o el documento WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como describen, por ejemplo, Schakowski *et al.* (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con fosfato de calcio (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147; Benvenisty y Reshef, 1986; Wigler *et al.* 1978; y Coraro y Pearson, 1981). Tales vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, el documento US 5.589.466 y el documento US 5.973.972).

El vector puede ser uno que sea 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 (Van Heeke y Schuster, 1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares.

Un vector de expresión puede ser también, o alternativamente, un vector adecuado para su expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para su 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 por Ausubel *et al.* 1987, y Grant *et al.* 1987).

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 en ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito al cloroplasto), secuencias de localización/anclaje de membrana (p. ej., secuencias de transferencia de parada, secuencias de anclaje GPI) y similares.

En un vector de expresión, 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 IE de CMV 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 conveniente de clonación (p. ej., un policonector). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la técnica reconocerá que dichos 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 célula anfitriona puede ser una célula anfitriona recombinante eucariótica o procariótica, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo anti-AXL 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, la célula puede comprender un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión del anticuerpo anti-AXL. La célula 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 del anticuerpo anti-AXL.

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 tales 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, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, 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, PER.C6, células

NSO 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, PER.C6, células NSO, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

El anticuerpo puede producirse alternativamente a partir de un hibridoma preparado a partir de células B esplénicas murinas obtenidas a partir 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 una región extracelular de AXL. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de mamíferos humanos o no humanos inmunizados tales como conejos, ratas, perros, primates, etc.

Los anticuerpos humanos se pueden generar 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 pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadena γ y κ endógenos (Lonberg *et al.* 1994a). En consecuencia, los ratones montan una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg *et al.* 1994b; Lonberg y Huszar, 1995; Harding y Lonberg, 1995). La preparación de ratones HuMAb es descrita en detalle por Taylor *et al.* 1992; Chen *et al.* 1993; Tuaillon *et al.* 1994; y Fishwild *et al.* 1996. Véanse también los documentos US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.789.650; US 5.877.397; US 5.661.016; US 5.814.318; US 5.874.299; US 5.770.429; US 5.545.807; WO 98/024884; WO 94/025585; WO 93/001227; WO 92/022645; WO 92/003918; y WO 01/009187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. Además, se pueden generar anticuerpos humanos a partir de ratones o ratas transgénicos para producir anticuerpos quiméricos humano-rata que se pueden utilizar como fuente para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales completamente humanos.

Adicionalmente, los anticuerpos humanos se pueden identificar a través de tecnologías de tipo de presentación, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación en retrovirus, presentación en ribosomas, presentación en mamíferos, presentación en levadura y otros mecanismos conocidos en la técnica, y las moléculas resultantes se pueden someter a una maduración adicional, tal como la maduración por afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica.

Tabla 4 - Secuencias

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
1	VH 107	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SGFTFSSY AMNWVRQAPGK GLEWVST TS SGSGAST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC AKIWIAFDI WGQGTMTVSS	Ab que se une al dominio Ig1 de HCo12-BalbC
2	VL 107	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQ YGSSPYT FGQGTKLEIK	
3	VH 140	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SGFTFSSY AMTWVRQAPGK GLEWVSA ISISGAST FYADSVKGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLR EDTAVYFC RGYS GYVYDAFDI WGQGTMTVSS	
4	VL 140	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISNW LAWYQQKPEKA PKSLIY AAS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC Q QYNSYPLT FGGGTKVEIK	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
5	VH 148	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMTWVRQAPGK GLEWVSA <u>ISISGGST</u> FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR EDTAVYYC <u>RGYSGYVYDAFDF</u> WGQGTMTVSS	Ab que se une al dominio Ig2 de HCo12-BalbC
6	VL 148	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>QGISNW</u> LAWYQQKPEKA PKSLIY <u>AAS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYNSYPLT</u> FGGGTKVEIK	
7	154 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGK GLEWVSA <u>ISIGGN</u> AYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AADTAVYYC <u>AKPGFIMVRGPLDY</u> WGQALVTSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo12-BalbC
8	VH 154-M103L	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGK GLEWVSA <u>ISIGGN</u> AYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR	
		AADTAVYYC <u>AKPGFILVRGPLDY</u> WGQALVTSS	
9	VL 154	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVNSY</u> LAWYQQKPGQA PRLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>Q</u> <u>QYGSSPYT</u> FGQGTKLEIK	
10	VH 171	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVSGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> LSYAFDIWGQGTMTVSS	Ab que se une al dominio Ig2 de HCo17-BalbC
11	VL 171	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
12	VH 172	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVSGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> LSYAFDIWGQGTMTVSS	
13	VL 172	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
14	VH 181	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVSGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> LSYAFDIWGQGTMTVSS	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
15	VH 181	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
16	VH 183	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>INQSGST</u> NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTVTVSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo17-BalbC
17	VH 183-N52Q	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>IQQSGST</u> NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTVTVSS	
18	VL 183	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQHKPGKA PKLLIY <u>ATSS</u> LQSGVTSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ AKSFPWT</u> FGQGTKVEIK	
19	VH 187	QVPLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY <u>GGSFSGYH</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>ISHSGRT</u> NYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSVTAA D TAVYYC <u>ASFITMIRGTIITHFDY</u> WGQGLTVTVSS	
20	VL 187	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPEKA PKSLIY <u>AASS</u> LQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q QHSPYPT</u> FGQGTKLEIK	
21	VH 608-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS <u>GGTFSSYA</u> ISWVRQAPGQ GLEWMGR <u>IPIFGIA</u> NYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR A EDTAVYYC <u>ARRGDYGGSPDVFDI</u> WGQGMVTVSS	
22	VL 608-01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ YGSSYT</u> FGQGTKLEIK	
23	VH 610-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS <u>GGTFSSYA</u> ISWVRQAPGQ GLEWMGR <u>IPIFGIA</u> NYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR A EDTAVYYC <u>ARRGNYYGGSPDVFDI</u> WGQGMVTVSS	
24	VL 610-01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ YGSSYT</u> FGQGTKLEIK	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
25	VH 613	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWMRQAPG QGLEWMGR ~~IIP~~ IFGIVNYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDIWGQGTMTVSS	Ab que se une al dominio Ig1 de HCo20
26	VL 613	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA ~~SS~~ RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSYTFGQGTKLEIK	
27	VH 613-08	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWMRQAPG QGLEWMGR ~~IIP~~ IFGIVNYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDIWGQGTMTVSS	
28	VL 613-08	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQR SNWLTFGGGTKVEIK	
29	VH 620-06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI ~~SW~~ VWRQAPGQ GLEWMGR ~~IIP~~ IFGIAN ~~Y~~ AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR EDTAVYYCARRGNYYGSGSPDVFDIWGQGTMTVSS	
30	VL 620-06	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA ~~SS~~ RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSYTFGQGTKLEIK	
31	VH 726	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIDGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEISHSGRTN ~~YN~~ PSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSVAAD TAVYYCARFITMIRGAIITHFDYWGQALVTSS	Ab que se une al dominio FN2 de HCo17-BalbC
32	VH 726-M101L	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIDGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEISHSGRTN ~~YN~~ PSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSVAAD TAVYYCARFITLIRGAIITHFDYWGQALVTSS	
33	VL 726	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QYHSYPYTFGQGTKLEIK	
34	VH 733	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSTYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGD ~~NK~~ YSADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGRKLGI ~~DA~~ FDIWGQGTMTVSS	Ab que se une al dominio FN1 de HCo17-BalbC

ES 2 784 685 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
35	VL 733	AIQLTQSPSSLASVGDRTITCRAS QGISSA LAWYQQKPGKAPK LLIY DASS LESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC QQF NSYPFT FGPGTKVDIK	
36	CDR1 de VH 107	GFTFSSYA	
37	CDR2 de VH 107	TSGSGAST	
38	CDR3 de VH 107	AKIWIAFDI	
39	CDR1 de VL 107	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 107	GAS	
40	CDR3 de VL 107	QQYGSSPYT	
41	CDR1 de VH 140	GFTFSSYA	
42	CDR2 de VH 140	ISISGAST	
43	CDR3 de VH 140	RGYSGYVYDAFDI	
44	CDR1 de VL 140	QGISNW	
	CDR2 de VL 140	AAS	
45	CDR3 de VL 140	QQYNSYPLT	
46	CDR1 de VH 148	GFTFSSYA	
47	CDR2 de VH 148	ISISGGST	
48	CDR3 de VH 148	RGYSGYVYDAFDF	
49	CDR1 de VL 148	QGISNW	
	CDR2 de VL 148	AAS	
50	CDR3 de VL 148	QQYNSYPLT	
51	CDR1 de VH 154	GFTFSSYA	
52	CDR2 de VH 154	ISIGGGNA	
53	CDR3 de VH 154	AKPGFIMVRGPLDY	
54	CDR3 de VH 154-M103L	AKPGFILVRGPLDY	
55	CDR1 de VL 154	QSVSNSY	
	CDR2 de VL 154	GAS	
56	CDR3 de VL 154	QQYGSSPYT	
57	CDR1 de VH 171	GFTFSSYA	
58	CDR2 de VH 171	ISVSGGST	
59	CDR3 de VH 171	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
60	CDR1 de VL 171	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 171	GAS	
61	CDR3 de VL 171	QQYGRSFT	
62	CDR1 de VH 172	GFTFSNYA	
63	CDR2 de VH 172	ISVSGGST	
64	CDR3 de VH 172	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
65	CDR1 de VL 172	QSVSSSY	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
	CDR2 de VL 172	GAS	
66	CDR3 de VL 172	QQYGRSFT	
67	CDR1 de VH 181	GFTFSSYA	
68	CDR2 de VH 181	ISVSGGST	
69	CDR3 de VH 181	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
70	CDR1 de VL 181	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 181	GAS	
71	CDR3 de VL 181	QQYGRSFT	
72	CDR1 de VH 183	GGSFSGYY	
73	CDR2 de VH 183	INQSGST	
74	CDR2 de VH 183-N52Q	IQQSGST	
75	CDR3 de VH 183	ASGNWDHFFDY	
76	CDR1 de VL 183	QGISSW	
	CDR2 de VL 183	ATS	
77	CDR3 de VL 183	QQAKSFPWT	
78	CDR1 de VH 187	GGSFSGYH	
79	CDR2 de VH 187	ISHSGRT	
80	CDR3 de VH 187	ASFITMIRGTIITHFDY	
81	CDR1 de VL 187	QGISSW	
	CDR2 de VL 187	AAS	
82	CDR3 de VL 187	QQYHSYPYT	
83	CDR1 de VH 608-01	GGTFSSY A	
84	CDR2 de VH 608-01	IIPIFGIA	
85	CDR3 de VH 608-01	ARRGDYYGSGSPDVFDI	
86	CDR1 de VL 608-01	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 608-01	GAS	
87	CDR3 de VL 608-01	QQYGSSYT	
88	CDR1 de VH 610-01	GGTFSSYA	
89	CDR2 de VH 610-01	IIPIFGIA	
90	CDR3 de VH 610-01	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
91	CDR1 de VL 610-01	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 610-01	GAS	
92	CDR3 de VL 610-01	QQYGSSYT	
93	CDR1 de VH 613	GGTFSSYA	
94	CDR2 de VH 613	IIPIFGIV	
95	CDR3 de VH 613	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
96	CDR1 de VL 613	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 613	GAS	

ES 2 784 685 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
97	CDR3 de VL 613	QQYGSSYT	
98	CDR1 de VH 613-08	GGTFSSYA	
99	CDR2 de VH 613-08	IIPIFGIV	
100	CDR3 de VH 613-08	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
101	CDR1 de VL 613-08	QSVSSY	
	CDR2 de VL 613-08	DAS	
102	CDR3 de VL 613-08	QQRSNWLT	
103	CDR1 de VH 620-06	GGTFSSYA	
104	CDR2 de VH 620-06	IIPIFGIA	
105	CDR3 de VH 620-06	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
106	CDR1 de VL 620-06	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 620-06	GAS	
107	CDR3 de VL 620-06	QQYGSSYT	
108	CDR1 de VH 726	GGSFSGYY	
109	CDR2 de VH 726	ISHSGRT	
110	CDR3 de VH 726	ARFITMIRGAIITHFDY	
111	CDR3 de VH 726-M101L	ARFITLIRGAIITHFDY	
112	CDR1 de VL 726	QGISSW	
	CDR2 de VL 726	AAS	
113	CDR3 de VL 726	QQYHSYPYT	
114	CDR1 de VH 733	GFSFSTYA	
115	CDR2 de VH 733	ISYDGDNK	
116	CDR3 de VH 733	ARGRKLIGIDAFDI	
117	CDR1 de VL 733	QGISSA	
	CDR2 de VL 733	DAS	
118	CDR3 de VL 733	QQFNSYPFT	
119	CDR2 de VH del dominio Ig2	ISISGXST - en donde X es A o G	
120	CDR3 de VH del dominio Ig2	RGYSGYVYDAFDX - en donde X es I o F	
121	CDR1 de VH del dominio FN2	GGSFSGYX - en donde X es H o Y	
122	CDR3 de VH del dominio FN2	AX1FITMIRGX2IITHFDY - en donde X1 es S o R; y X2 es T o A	
123	CDR1 de VH del dominio FN1	GFTFSXYA - en donde X es S o N	
124	CDR2 de VH del dominio FN1	ISVSGGST	
125	CDR3 de VH del dominio FN1	AKEGYIWFGESELSYAFDI	
126	CDR2 de VH del dominio Ig1	IIPIFGIX- en donde X es A o V	
127	CDR3 de VH del dominio Ig1	ARRGXYYGSGSPDVFDI -donde X es D o N	
128	CDR1 de VL del dominio Ig1	QSVXSSY - en donde X es S o del	
	CDR2 de VL del dominio Ig1	XAS - en donde X es D o G	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
129	CDR3 de VL del 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	
130	Proteína AXL humana (Swissprot P30530)	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEVDLL WLQDAVPLATAPGHGPPQRSLLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLPHPT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNTVCVAAATAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVA VKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSER ESFPAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMA DIASGMEYLSKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIY NGDYRQGRGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMW EATRGTPTYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSR CWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTAAEVHPAGRYVLC PST TPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
131	AXL de Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQ TEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGG QILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLISALQLSDAGEYQ CMVHLEGRFTVSQPGFVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSC QAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLSQTPGLNKTSSFS CEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPG LSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPH QLRLEKLLPHTPYHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPP ENVSAMRNGSQVLVRWQEPVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPV LMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPL EPWRPGQGQPLHLVSEPPPPAFSWPWWYVLLGAVVAAACV LILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTE	
		ATLNSLGISEELKEKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQ LNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVM RLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGDQPVYL PTQMLVKFMADIASGMEYLSKRFIHRDLAARNCMLNENMSV CVADFGLSKKIYNGDYRQGRGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSD VWSFGVTMW EATRGTPTYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCL DGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEI LYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTAAEVH PAGRYVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
132	AXL de Homo sapiens - Dominio Ig1 de Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSD ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR YVLCPTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
133	AXL de Homo sapiens - Dominio Ig2 de Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSD ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR	
		YVLCPTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	

ES 2 784 685 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
134	AXL de Homo sapiens - dominio FN1 de Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLL WLQDAVPLATAPGHGHPQRS LHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQRP HHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNL QAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTP YHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQA FVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLM DIGLRQEVTL LQGDGVSNTLVCVAAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPV HQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKE TRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEK LRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDD ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFG VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR YVLC PSTTSPAPQPADRGSPAAPGQEDGA	
135	AXL de Homo sapiens - dominio FN2 de Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLL WLQDAVPLATAPGHGHPQRS LHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQRP RLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNG SQVLVRWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEVLM DIGLTREVT LELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGQP LHHLVSEPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKE KL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDD SILKVA KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTMLVKFMAD IASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYN GDYRQRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFGVTMWEI ATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLC PSTT PSPAPQPADRGSPAAPGQEDGA	
136	VH 511	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYA MNWVRQAPGK GLEWVSG ISGSGGHT YHADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC AKDRYDILTGYNNLLDY WGQGT LVTVSS	Enlace de dominio Ig2 Ab
137	CDR1 de VH 511	GFTFSSYA	
138	CDR2 de VH 511	ISGSGGHT	

ES 2 784 685 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
139	CDR3 de VH 511	AKDRYDILTGYYNLLDY	
140	VL 511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPEEAP KSLIYA <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YNSYPLT</u> FGGGAKVEIK	
141	CDR1 de VL 511	QGISSW	
	CDR2 de VL 511	AAS	
142	CDR3 de VL 511	QQYNSYPLT	
143	VH 061	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTGYGISWVRQAPGQ GLEWIGWISAYNGNTNYVQNLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARDHISMLRGIIRNYWGQGTLLTVSS	Dominio Ig1 que se une a Ab
144	VL 061	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRS SWPRLTFGGGTKEIK	
145	VH 137	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSRYAISWVRQAPGQ GLEWMGRIIPVIGIANYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAREAGYSSSWYAEYFQHWGQGTLLTVSS	
146	VL 137	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPR RLIYGASSRATGFPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPYTFGQGTKEIK	
147	AXL de mono cinomolgo (número GenBank HB387229.1)	AWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTAEESEPFVGNP GNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRIASLQSDAGQYQCLVFLGHQNFV SQPGYVGLGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDL LWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGV TSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHPHTP YHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQ AFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLM DIGLRQEVT ELQGDGVSNTVCVAAAYTAAGDGPWVSLPVEAWRPGQAQ VHQLVKETSAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFTEPTVERGELVVRVVRKSYRRTTEATLNSLGISEELKE KLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVA KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDPVYLPTQMLVKFMAD IASGMEYLSKRFIHRDLAARNCMLENMNSVCVADFGLSKKIYN GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMWEI ATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQLDPKDCSCLTSAEVHPAGRYVLCPTA PSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
148-153		Véase el Ejemplo 3	

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que se deben interpretar como una limitación adicional.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Inmunización y generación de anticuerpos contra AXL.

Construcciones de expresión para AXL

Se generaron las siguientes construcciones de codones optimizados para la expresión de diversas variantes de AXL completa: AXL humana (*Homo sapiens*) (número de acceso de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de humano-mono cinomolgo en la que el dominio extracelular (ECD) humano fue reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) (traducción del acceso de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de 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 humano-ratón en la que el dominio I de tipo Ig humana (aa 1-134, también denominado "dominio Ig1" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de humano-ratón en la que el dominio II de tipo Ig humana (aa 148-194, también denominado "dominio Ig2" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón, ALX quimérica de humano-ratón en la que el dominio I de tipo a FNIII humano (aa 227-329, también denominado "dominio FN1" en la presente memoria) fue reemplazado por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón, AXL quimérica de 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 de codones optimizados para diversas variantes de ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta de 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 de His C-terminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios Ig1 e Ig2 de AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta de 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). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen).

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).

Purificación de AXL con etiqueta de His

AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig12ECDHis se expresaron en células HEK-293F. La etiqueta de His permite la purificación con cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. En este procedimiento, un quelante fijado sobre la resina cromatográfica se carga con cationes Co^{2+} . Los sobrenadantes que contenían proteína marcada con His se incubaron con la resina en modo discontinuo (es decir, solución). La proteína etiquetada con His se une fuertemente a las cuentas 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 cuentas se recuperan del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava para eliminar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas marcadas 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 retira de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalinización.

Inmunización

Los anticuerpos IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-726 se obtuvieron a partir de las siguientes inmunizaciones: ratones transgénicos (Medarex, San José, CA, EE.UU.) HCo12-BalbC (IgG1-AXL-

107), HCo17-BalbC (IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726) y HCo20 (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-613) que se inmunizaron de forma alterna por vía intraperitoneal (IP) con 20 µg de la proteína AXLECDHis (IgG1-AXL-511, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-183) *et al.* 20 µg de AXL-FN2ECDHis más 20 µg de AXL-Ig12ECDHis (IgG1-AXL-726), o 20 µg de AXL-Ig12ECDHis (IgG1-AXL-107) y subcutáneamente (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 a partir de inmunizaciones que se realizaron todas en el sistema coadyuvante Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Los anticuerpos IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-171 e IgG1-AXL-733 se obtuvieron a partir de las siguientes inmunizaciones: ratones transgénicos 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.) fueron inmunizados con 20 µg de la proteína AXLECDHis en CFA. Posteriormente, se inmunizaron ratones de forma alterna 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 análisis FMAT de detección específica 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 inyectada 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 Fluorometric Micro Volume Assay Technology (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 ensayo de 4, se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a células A431 (DSMZ) y MDA-MB-231 (que expresan ambas AXL en la superficie celular), así como la unión a TH1021-AXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana completa; producidas como se describió anteriormente) y células de tipo salvaje HEK293 (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 ensayo de 8, se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a TH1021-hAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de humano-cinamolgo en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD de AXL de mono cinamolgo), TH1021-mAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente las quimeras AXL de 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 siendo reemplazado el dominio I de tipo Ig por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mIg2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio II de tipo Ig por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mFN1 (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio I de tipo FNIII por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio II de tipo FNIII por el dominio II de tipo FNIII de AXL de ratón), y células de tipo salvaje HEK293 (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 Humana de cabra-DyLight649; Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo de ratón humanizado específico AXL A0704P (producido en células HEK-293F) se utilizó como control positivo y el suero reunido de ratón HuMab e 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 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.

Generación de hibridoma HuMab

Se sacrificó el ratón HuMab con suficiente desarrollo de título específico de antígeno (descrito anteriormente) y se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos que flanquean 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 los pocillos primarios específicos en medio semisólido preparado 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 analizar de acuerdo con el ensayo de unión específica de antígeno como se describió anteriormente y se escanearon utilizando el sistema IsoCyte (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Los niveles de IgG se midieron utilizando un Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU) con el fin de 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. et al., 2006). Los clones derivados de este procedimiento se denominaron PC1021.

Espectrometría de masas de anticuerpos purificados

Se purificaron pequeñas alícuotas de 0,8 mL de sobrenadante de hibridoma que contenía anticuerpo del 6 pocillos o etapa 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: Binding Buffer PBS (B. Braun, Medical BV, Oss, Países Bajos) y Elution Buffer Glicina-HCl 0,1 M de pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2 M de 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 pocillos cuadrada de 100 µl, Núm. de componente 186002631). Las muestras se desglucosilaron durante la noche a 37°C con N-glicosidasa F. Se añadió DTT (15 mg/mL) (1 µl/pocillo) y se incubó durante 1 h a 37°C. Las muestras (5 o 6 µl) se desalinizaron en un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, EE.UU) con una columna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1x 50 mm a 60°C. Se utilizaron agua MQ y acetonitrilo de grado 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 tiempo de vuelo con ionización por electronebulización 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, los resultados de otras pruebas se utilizaron para decidir qué anticuerpo era el mejor material para continuar los experimentos.

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

El ARN total se preparó a partir de 0,2 a 5x10⁶ células de hibridoma y ADN complementario (ADNc) 5'-RACE 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 mediante 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 4. Las secuencias CDR se definieron de acuerdo con IMGT (Lefranc *et al.* 1999 y Brochet, 2008). 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 293-F Freestyle™ utilizando 293fectina.

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).

Anticuerpos de control contra AXL

En algunos de los ejemplos, se utilizó un anticuerpo de comparación contra AXL (IgG1-YW327.6S2) que se ha descrito previamente (documento EP 2 220 131, U3 Pharma; WO 2011/159980, Genentech). Las secuencias VH y VL para estos anticuerpos específicos de AXL se clonaron en los vectores de expresión pGlf y pKappa.

anticuerpo b12

En algunos de los ejemplos, el anticuerpo b12, un anticuerpo específico de gp120 (Barbas, 1993) se utilizó como control negativo.

Expresión

Los anticuerpos se expresaron como IgG1,κ. Las mezclas de ADN plasmídico que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se transfectaron transitoriamente a células HEK293F de Freestyle (Invitrogen, EE.UU) Utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU) esencialmente según lo descrito por el fabricante.

Purificación de anticuerpos.

El sobrenadante de cultivo se filtró sobre filtros transversales de 0,2 µm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Health Care) y se eluyó con citrato de sodio 0,1 M-NaOH, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, 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 en una columna de desalinización HiPrep y el anticuerpo se cambió a NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se sometieron a filtración estéril sobre filtros transversales de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración de IgG se midió utilizando un 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 de codones optimizados para la expresión de diversas variantes de AXL completa: AXL humana (*Homo sapiens*) (número de acceso de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de humano-mono cinomolgo en la que el dominio extracelular (ECD) humano fue reemplazado por el ECD de AXL de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) (traducción del acceso de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de 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 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 humano-ratón en la que el dominio II de tipo Ig humano (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 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 con el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón, AXL quimérica de humano-ratón en la que el dominio II de tipo FNIII humano (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 de codones optimizados para diversas variantes de ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta de 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 de His C-terminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios Ig1 e Ig2 de AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta de 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 transfectaron 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 con etiqueta de His

AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig12ECDHis se expresaron en células HEK293F y se purificaron con

cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.

Inmunización

5 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 diversas cantidades de anticuerpos del proceso del hibridoma
tradicional. El ratón A (3,5% de aciertos en el proceso del hibridoma) era un ratón transgénico HCo17-BALB/c
10 (Bristol-Myers Squibb, Redwood City, CA, EE.UU) se inmunizó alternativamente por vía intraperitoneal (IP) con 20
µg de AXL-FN2ECDHIS más 20 µg de AXL-Ig12ECDHIS y subcutáneamente (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 del hibridoma) era un
15 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 del hibridoma) era un ratón HCo12-
BALB/c inmunizado 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. El ratón D (0% de aciertos en el proceso del hibridoma) era un ratón transgénico HCo12 (Medarex) inmunizado
20 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 de 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 inyectado 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). El ADNc de la primera hebra
para 5'-RACE se sintetizó utilizando 150 ng de ARN utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE
30 (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU), PrimeScript Reverse Transcriptase (Clontech) y el oligo y oligodT SMART
IIA como cebadores. Las regiones que codifican VL se amplificaron mediante PCR utilizando la polimerasa
Advantage 2 (Clontech), los cebadores RACEkLIC4shortFW2 (320 nM), RACEkLIC4LongFW2 (80 nM) y
RACEkLICRV_PmlA3 (400 nM), realizando 35 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 68°C. Las regiones
35 codificantes de VH se amplificaron mediante 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 *et al.*, 20 segundos a 66°C y 30 segundos a 72°C, terminando con una etapa final
de extensión de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR que codifican 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 MiniElute de Qiagen. Las regiones codificantes de VH y VL amplificadas mediante PCR se clonaron,
40 en marco, en los vectores de expresión de mamíferos pGlf (que contiene la secuencia de ADN que codifica la región
constante de IgG1 humana) para la región VH y pKappa (que contiene la secuencia de ADN que codifica la región
constante de cadena ligera kappa) para la región VL, por clonación independiente de la ligación (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 contienen cada una un solo vector de expresión HC o LC.

Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
SMARTIIA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG (SEQ ID NO: 154)
RACEkLIC4shortFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACT (SEQ ID NO: 155)
RACEkLIC4LongFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGA (SEQ ID NO: 156)
RACEkLICRV_PmlA3	5'-CAGCAGGCACACCACTGAGGCAGTTCAGATTTC (SEQ ID NO: 157)
RACEG1LIC3shortFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACT (SEQ ID NO: 158)
RACEG1LIC3longFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID NO: 159)
RACEG1LIC3RV2	5'-GGAGGAGGGCGCCAGTGGGAAGACCGA (SEQ ID NO: 160)
CMV P f (RRA2)	5'-GCCAGATATACGCGTTGACA (SEQ ID NO: 161)
TK pA r (RRA2)	5'-GATCTGCTATGGCAGGGCCT (SEQ ID NO: 162)

PCR de EEL

Los elementos de expresión lineal (EEL) se produjeron amplificando el fragmento que contenía el promotor CMV, las regiones que codifican HC o LC y la señal de poli A que contiene elementos 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 minutos (LC) o 3 (HC) a 68°C, utilizando material de colonias de E. coli (cepa DH5α), que contiene 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 codifican cadenas de anticuerpos tanto pesadas como ligeras se transfectaron transitoriamente en células Freestyle 293-F (HEK293F) (Life technologies, EE.UU) utilizando 293fectin (Life technologies) esencialmente como describen Vink, T. et al. (2014) ('A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies', Methods, 65 (1), 5-10).

Para la expresión EEL de los Ab, se mezclaron 1 µl de la mezcla de reacción de PCR de EEL de HC, 1 µl de la mezcla de reacción de PCR de LC y 1 µl de una mezcla potenciadora de 30 ng/µl que contiene 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 293fectina 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 AXLECDHIS

Las placas ELISA (Greiner, Países Bajos) se recubrieron con 100 µl/pocillo de AXLECDHIS 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 contiene 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 de cabra anti-IgG humana acoplado a 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 suficiente señal y la reacción se detuvo al añadir 100 µl de solución de ácido oxálico al 2%. Se midieron placas de 96 pocillos en un lector ELISA a 405 nm.

Escrutinio de diversidad

Las muestras se analizaron para determinar la unión de los anticuerpos a TH1021-hAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de humano-cinomo en las que el ECD humano había sido reemplazado por el ECD del mono cinomo AXL), TH1021-mAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de 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 AXL humana siendo reemplazado el dominio I de tipo Ig por el dominio I de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mLg2 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio II de tipo Ig por el dominio II de tipo Ig de AXL de ratón), TH1021-mFN1 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio de tipo FNIII I por el dominio I de tipo FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (células HEK293F que expresan transitoriamente AXL humana siendo reemplazado el dominio II de tipo FNIII 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 EEL a las células para permitir la unión a las diversas construcciones de AXL. Posteriormente, se detectó la unión de anticuerpos utilizando un producto conjugado fluorescente (anti-Fc gamma de IgG humana de cabra DyLight649; Jackson ImmunoResearch). Las muestras se escanearon 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 recogieron 352 colonias bacterianas que contenían el vector de expresión para HC y 384 colonias bacterianas que contenían el vector de expresión para LC y se amplificaron mediante PCR para EEL. Parte de la reacción para EEL fue secuenciada (AGOWA). El porcentaje de construcciones que contenían el inserto VH

adecuado difirió 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 aciertos obtenidos en el proceso del 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 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 un grupo de LC

Los EEL que codificaban HC individuales se co-transfectaron con un grupo de 96 EEL que codificaban LC utilizando el protocolo de transfección EEL.

Selección de HC de anticuerpos de unión a AXL

Para los ratones B y D, los sobrenadantes de las co-transfecciones de EEL de la HC única con las LC reunidas 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 a AXL y 4 de los 4 HC del ratón D dieron como resultado la unión a AXL.

Para los sobrenadantes de ratón A y C de las co-transfecciones de EEL de la HC única con las LC reunidas se analizó la unión a AXL de las mezclas de anticuerpos producidas mediante el escrutinio de diversidad. Este escrutinio permitió tanto la identificación de HC que se unen a AXL como un mapeo epitópico aproximado, al identificar la pérdida de unión de anticuerpos con variantes de AXL. Del ratón A, aproximadamente 40% de las HC se unieron a 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 AXL humana, la mayoría de las cuales perdieron la unión al dominio Ig1 o Ig2, cuando estos dominios fueron reemplazados por el equivalente del ratón. Basándose en la unión según lo determinado 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

Cada EEL de HC individual de las 12 HC seleccionadas únicas se co-transfectó con 96 EEL de LC individuales del conjunto de LC de los ratones correspondientes.

Selección mediante LC de anticuerpos de unión a AXL

Los sobrenadantes de la expresión de EEL de las combinaciones únicas de HC/LC 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 tuvieron éxito en el proceso del hibridoma.

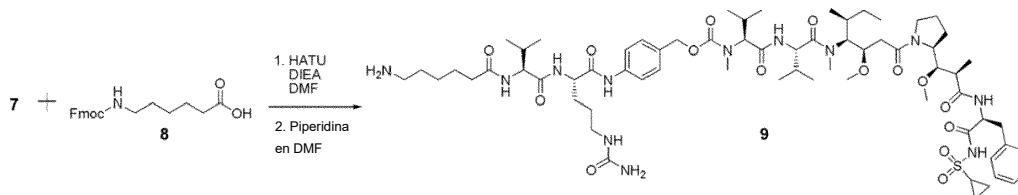
Afinidad de unión del anticuerpo 511

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

La afinidad se determinó utilizando Interferometría de Biocapa en un OctetRED384 ForteBio. Los biosensores de Captura de anti-Fc humano (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; Núm. de Cat. 18-5064) se cargaron durante 150 s con hlgG (1 µg/mL) con el objetivo de una respuesta de carga de 1 nm. Después de un estado basal (150 s), se determinó 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 probó en tres experimentos independientes.

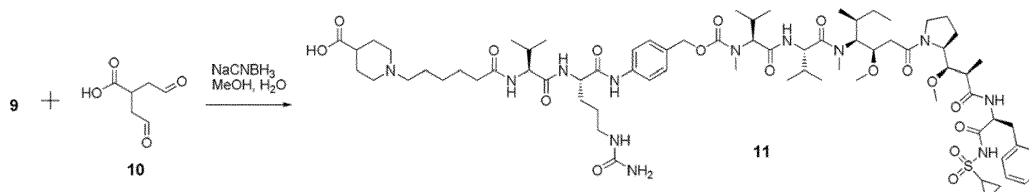
Los datos se analizaron con el Soporte Lógico de Análisis de Datos ForteBio v7.0.3.1, utilizando el modelo 1:1 y un ajuste global completo con 1000 s de tiempo de asociación y 1000 s de tiempo de disociación a menos que se indique lo contrario. Se utilizó un tiempo de disociación de 1000 s (en lugar del tiempo de disociación de 2000 s que se había adquirido) ya que esto dio como resultado mejores ajustes. El trazado de datos se corrigió restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del estado basal, y se aplicó la corrección entre pasos y el filtro de Savitzky-Golay.

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



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, a continuación, se purificó mediante HPLC para proporcionar el compuesto 9 en forma de la sal de TFA (235 mg, 64%); MS m/z 1353,8 (M + H).

Preparación del compuesto 11:



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 TA, y a continuación se purificó mediante HPLC dando lugar al compuesto 11 en forma de la sal de TFA (126 mg, 50%); MS m/z 1465,8 (M + H)

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

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 de Concortis Biosystems, Inc. (San Diego, CA) a través de conjugación covalente utilizando el conector AV1 K-lock valina-citrulina (vc) (documento WO 2013/173391, documento WO 2013/173392 y documento WO 2013/173393 de Concortis Biosystems).

Los productos conjugados de fármaco del anticuerpo anti-AXL se analizaron posteriormente para determinar la concentración (por absorbancia a 280 nm), la razón de fármaco a anticuerpo ('DAR') mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad del fármaco no conjugado (mediante cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (mediante LAL). Los resultados fueron los siguientes (Tabla 5):

Tabla 5

	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 mediante HIC-HPLC	1,71	1,79	1,77	2,05
% de fármaco no conjugado	6,67	4,16	5,38	4,19
% añadido mediante 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

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).

Las afinidades se determinaron utilizando Interferometría de Biocapa en un OctetRED384 ForteBio. Los biosensores de Captura de anti-Fc humano (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; Núm. de Cat. 18-5064) se cargaron durante 150 s con hlgG (1 µg/mL) con el objetivo de una respuesta de carga de 1 nm. Después de un estado basal (150 s), se determinó 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 probó 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 había adquirido) 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. El trazado de datos se corrigió restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del estado basal, y se aplicó la corrección entre pasos y el filtro de Savitzky-Golay.

Las afinidades (K_D) de los anticuerpos anti-AXL oscilaron entre $0,3 \cdot 10^{-9}$ M a $63 \cdot 10^{-9}$ M (Tabla 6). 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 6

Anticuerpo	Afinidad de enlace (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 contra AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 transfectadas se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,0024-10 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 conjugada 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 utilizando 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 1A** muestra que los anticuerpos HuMab contra AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresan AXL-ECD humano. Además, los anticuerpos HuMab contra AXL reconocieron AXL

con un ECD de mono cinomolgo, con valores de CE_{50} en el mismo intervalo que para AXL completamente humano (**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 7 muestra los valores de CE_{50} 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 (determinado en al menos 3 experimentos). Los valores de CE_{50} 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 7

Anticuerpo	CE50 de unión (µg/mL)	
	Promedio AXL humana (d.t.)	Promedio AXL de cinomolgo (d.t.)
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)

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

Se probó si el ligando de AXL Gas6 interfería en la unión a AXL de los anticuerpos contra AXL. Por lo tanto, las células A431 positivas para AXL se incubaron durante 15 minutos a 4°C con 10 µg/mL de Gas6 humana recombinante (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido; Núm. de Cat. 885-GS). Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas 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 conjugada 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%. 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 con anticuerpos, se añadieron diluciones seriadas de Gas6 humana recombinante (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido; Núm. de Cat. 885-GS) a las células 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).

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 incubación previa con Gas6 fue del 90-108% de unión sin preincubación con Gas6) (Tabla 7).

Los valores de CE₅₀ para la unión del anticuerpo contra AXL con o sin preincubación con Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo aumentados después de la preincubación con Gas6 (Tabla 8).

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.

10 En experimentos en los que las células A431 se incubaron previamente con anticuerpos anti-AXL, se evaluó la unión de Gas6 (n = 3). La unión de Gas6 a las células A431 fue similar con o sin preincubación con anticuerpos HuMab contra AXL. Las concentraciones CE₅₀ promedio de la unión de Gas6 cuando las células se incubaron previamente con 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 de 17% de la unión en presencia del anticuerpo control negativo b12.

Tabla 8

Anticuerpo	Anticuerpo que se une a las células A431			Gas6 que se une a las células A431	
	CE50 sin Gas6 CE50 (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					
* Los valores de CE ₅₀ son menos precisos debido a la baja unión.					

20 Ejemplo 3 - El mapeo de epítomos estudia el panel de anticuerpos anti-AXL

25 Determinación de la especificidad del dominio AXL utilizando moléculas quiméricas de AXL de humano-ratón

La especificidad del dominio AXL de los anticuerpos contra AXL se determinó utilizando un panel de mutantes de AXL quiméricos de humano-ratón. Se generaron cinco moléculas 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 de codones optimizados para la expresión de las quimeras AXL de humano-ratón se generaron y expresaron en células HEK293F como se describe en el Ejemplo 1:

5

AXL de *Homo sapiens* (p33-HAMs-AXL): (SEQ ID:148)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAPRGTAQAEESPFVGNPGNITGARGLTG
TLRCQLQVQGEPPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFV
SQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEVDLLWLQDAVPLATAPGHGPPQSLHVPGLNKTSS
FSCEAHNAKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSNDGMGIQAGEPDP
PEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHW
QEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVLM DIGLRQEVTLQGDGVSNTVCVAAAYAAGDGPWSLPVPLEAWR
PGQAQPVHQLVKEPSTPAFSPWVWVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETVERGELVVRYRVRK
SYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDILKAVKTMKIAICTRSEL
EDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMA
DIASGMEYLSKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFLSKKIYNGDYRQGRKAKMPVKWIAIESLADRVYTSKS
DVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLE
NTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTTPSPAQP
ADRGSPAAPGQEDGA

10

AXL de *Mus musculus* (p33-HAMm-AXL): (SEQ ID:149)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGL
TGTLRCQLQVQGEPEVWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQLRISALQLSDAGEYQCMVHLEG
RTFVSQPGFVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEVTLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPLNKG
TSSFSCEAHNAKGVTTSTRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGK
SDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRISCSQSPSWTHWLPVETTEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLV
RWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPVLM DIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPW
RPGQGQPLHHLVSEPPPRAFSPWVWVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETVERGELVVRYRVR
KSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDILKAVKTMKIAICTRSE
LEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFM
ADIASGMEYLSKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFLSKKIYNGDYRQGRKAKMPVKWIAIESLADRVYTSK
SDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDL
ENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTTPSPAQ
PADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* - Dominio Ig1 de *Mus musculus* (p33-AXL-mlg1): (SEQ ID NO: 150)

15

AXL de *Homo sapiens* - Dominio Ig1 de *Mus musculus* (p33-AXL-mlg1): (SEQ ID NO: 150)

MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGEPEPEV
WLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVGLEGLPYFL
EPEPDRTPVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSR
TATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQ
LRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYR
LAYQGQDTPPEVLMDIGLRQEVTLQGDGGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEP
STPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGIS
EELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHP
NVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHR
DLAARNCMLNENMSVCVADFLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMWEIATR
GQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILY
VNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* - Dominio Ig2 de *Mus musculus* (p33-AXL-mlg2): (SEQ ID NO: 151)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQV
QGEPEPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGL
EGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSQTPGLNKTSSFSCEAHNAK
GVTTSRATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQAS
VPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGT
LLGYRLAYQGQDTPPEVLMDIGLRQEVTLQGDGGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQL
LVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATL
NSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHG
DLHSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFLSKKIYNGD
YYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLD
GLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

5

AXL de *Homo sapiens* - Dominio FN1 de *Mus musculus* (p33-AXL-mFN1): (SEQ ID NO: 152)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEPEVHWLR
DGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLPYFLEEPED
RTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRATIT
VLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEK

10

LLPHTPYHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQQQ
 DTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFS
 WPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEK
 LRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSLKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMR
 LIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAAR
 NCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPY
 PGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDE
 GGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* - Dominio FN2 de *Mus musculus* (p33-AXL-mFN2): (SEQ ID NO: 153)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQV
 QGEPPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGL
 EGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLSHVPGLNKTSSFSCEAHNA
 KGVTTSTRATITVLPQQPRNLHLSRQPTLEVAVWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMIQAGEPDPPEELTSQ
 ASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLVRWQEPVRPL
 QGTLLGYRLAYRGQDTPEVLMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSPVPLEPWRPGQGQPLH
 HLVSPEPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFETPVERGELVVRYRVRKSYSRRTEAT
 LNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSLKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC
 MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHFLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMADIASGMEYL
 STKRFIHRDLAARNCMLENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVT
 MWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPA
 QEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTTPSPAQPADRGSPA
 PGQEDGA

5

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

- 10 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 AXL humano fue reemplazado por su homólogo murino (**Figura 2B**). Se incluyó el anticuerpo monoclonal AXL que presentaba reacción cruzada de humano-ratón YW327.6S2 para confirmar la expresión de hsAXL-mmECD.
- 15 Los anticuerpos anti-AXL 107 y 613 mostraron una unión fuertemente reducida a hsAXL-mmIg1 (**Figura 2C**), indicando el reconocimiento de un epítipo en el dominio Ig1 de AXL. IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-171 mostraron una fuerte reducción de la unión a hsAXL-mmIg2 (**Figura 2D**), que indica el reconocimiento de un epítipo en el dominio Ig2 de AXL. IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-733 mostraron una reducción de la unión 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
- 20 perdió en hsAXL-mmFN2 (**Figura 2F**), indicando el reconocimiento de un epítipo dentro del dominio FN2.

La especificidad del dominio AXL para todos los anticuerpos anti-AXL se resume en la Tabla 9.

Tabla 9

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.

Anticuerpo	Especificidad de dominio AXL	aa de AXL implicados en la unión
IgG1-AXL-171	Ig2	P170, T182-R190
IgG1-AXL-183	Fn1	No resuelto
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 de epítomos de alta resolución para identificar aminoácidos en el dominio extracelular de AXL implicados en la unión de anticuerpos contra AXL

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 codifica AXL humana (Hs) se mezcló con plásmidos de clonación que codifican 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 dos cebadores específicos para el vector de clonación o de expresión para realizar una PCR que amplifica el dominio extracelular de AXL (ECD) con un tiempo de elongación abreviado, forzando la fusión y el re-emparejamiento de las hebras de replicación de ADN nacientes 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.

Los productos de 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 codifican los homólogos de AXL de Hs, Mm, Md, Ac y Tn, cuatro plásmidos quiméricos de humano/ratón que codifican AXL Hs con dominios Ig1, Ig2, Fn1 o Fn2 murinos, y los dieciséis plásmidos que más se diferenciaban de la biblioteca de recombinación se transfectaron a células HEK293-F de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por el fabricante (Life Technologies). Los datos de unión de FACS utilizando 1 µg/mL de anticuerpos anti-AXL se desconvolucionaron mediante la puntuación por aminoácido si la mutación se correlacionó (+1) o no (-1) con la pérdida de unión, después de lo cual se aplicó una corrección del valor de referencia y normalización a una escala de -5 a +5, que daba como resultado una puntuación de impacto por aminoácido sobre el ECD completo.

Los datos de unión desconvolucionados se resumen en la Tabla 9 como aminoácidos implicados en la unión. Los anticuerpos cuyos sitios de unión no pudieron mapearse a alta resolución debido a la falta de eventos de recombinación 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)

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

Se recogieron células A431 (5×10^6 células) en medio de cultivo (medio de cultivo RPMI 1640 con un suplemento de 10% de suero de ternera fetal (FSC)), al que se habían añadido 100 µCi de ^{51}Cr (Cromo-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) 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 de tripano. 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 mediante Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, gato 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 de tripano y se diluyeron a una densidad de 1×10^7 células/mL.

Establecimiento de ADCC

Se pipetearon 50 μ L de células diana marcadas con ^{51}Cr en placas de 96 pocillos, y se añadieron 50 μ L de anticuerpo, diluidos en RPMI1640/FSC al 10% (diluciones 1:3 al intervalo de concentraciones finales de 0,01-10 $\mu\text{g/mL}$). 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 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 5% de CO_2 . 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:

% de lisis específica = $(\text{cpm muestra} - \text{cpm células diana solo}) / (\text{cpm lisis máxima} - \text{cpm células diana solo})$, en donde cpm es cuentas por minuto.

IgG1-AXL-183-N52Q e IgG1-AXL-733 indujeron de 15 a 21% de ADCC en células A431 a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (**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 ADCC significativa en células A431 a concentraciones de hasta 10 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3**).

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

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 contra AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 transfectadas transitoriamente se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos anti-AXL o ADC contra AXL (diluciones 1:4; intervalo de concentración final 0,003-10 $\mu\text{g/mL}$) 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 μL con anticuerpo secundario a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-F(ab')₂ de IgG humano 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%. 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.).

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

Ejemplo 6: Citotoxicidad in vitro inducida por productos conjugados de fármacos de anticuerpos específicos de AXL

Las células LCLC-103H (cáncer de pulmón de células grandes humanas) se cultivaron en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; Núm. de catálogo BE12-115F) con un suplemento de suero de ternera Cosmic Calf Serum 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 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin (Cambrex; Núm. de cat. DE17-603E). Las células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) se cultivaron en DMEM (Cambrex; Núm. de cat. BE12-709F) con un suplemento de suero de ternera Cosmic Calf Serum inactivado por calor al 10% (vol/vol) (Perbio; Núm. de cat. SH30087.03), piruvato sódico 1 mM (Cambrex; Núm. de cat. BE13-115E), L-glutamina 2 mM (Cambrex; Núm. de cat. US17-905C), MEM NEAA 100 μM (Invitrogen; Núm. de cat. 11140), 50 UI/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin (Cambrex; Núm. de Cat. DE17-603E). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 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 pasaron 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 seriadas (1:4; concentraciones finales que variaban de 0,00015 a 10 µg/mL) de productos conjugados de fármaco con anticuerpo contra AXL (ADC contra AXL; 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 100% de destrucción de células tumorales. Las células no tratadas se utilizaron como referencia para 0% de destrucción de 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. Posteriormente, se transfirieron 180 µL por pocillo a placas Optiplate™ de color blanco 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 de multiplacas EnVision (Envision, Perkin Elmer).

Los ADC contra AXL 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 **Figura 5A**. De un modo similar, la **Figura 5B** muestra que estos ADC contra AXL indujeron la citotoxicidad de las células MDA-MB-231 con valores de CI50 entre 0,005 y 0,015 µg/mL.

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

Las secuencias de proteínas de las regiones VH y VL del panel de anticuerpos anti-AXL (descrito en el Ejemplo 1) se alinearon y compararon para determinar la unión a AXL para identificar cambios críticos o permisivos de residuos de aminoácidos en las regiones VH o VL. Por lo tanto, los anticuerpos con regiones VH o VL idénticas se agruparon y compararon para determinar su unión a AXL humana y las diferencias en las secuencias 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 antígenos homogéneos 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 se numeró como posición '1', el segundo como posición '2', etc.

En primer lugar, 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 aminoácido 109; **Figura 6A**). Ambos anticuerpos se unían a AXL humana (Tabla 10), lo que indica que el aminoácido en la posición 109 no es esencial para la unión del anticuerpo, lo que supone que una mutación identificada en la región CDR2 (G por A en la posición de 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 10). Se permitieron 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, lo que supone 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 10). Las regiones CDR3 de estos tres anticuerpos eran idénticas, pero se permitió un cambio de residuo de aminoácido en la CDR1 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 10), lo que indica que el aminoácido en la posición 101 no es esencial, lo que supone 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 mostraron cinco diferencias de aminoácidos en la región CDR3 de la LC (RSNWL por YGSSY en las posiciones 92 a 96; **Figura 6E**). Ambos anticuerpos se unían al AXL humana (Tabla 10), lo que indica que la variación del aminoácido en las posiciones 92 a 96 está permitida y no afecta a la unión del anticuerpo, lo que supone 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 10

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

5

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

Conjugación de MMAE con anticuerpos anti-AXL

10 Los anticuerpos anti-AXL se purificaron mediante cromatografía de proteína A de acuerdo con procedimientos
convencional 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 a (véase Sun *et al.* 2005;
McDonagh *et al.* 2006; y Alley *et al.* 2008). La reacción se detuvo mediante la adición de un exceso de N-
15 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
fármaco/anticuerpo (DAR) mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción
hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco no conjugado (mediante cromatografía de fase inversa), el porcentaje de
agregación (mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (mediante
20 LAL). Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 11**.

Tabla 11 - Descripción general de las diferentes características de los productos conjugados de anticuerpo-fármaco.

Ensayo	ADC									
	IgG1 - AXL- 107	IgG 1- AXL 148	IgG1-AXL- 154-M103L	IgG1- AXL- 171	IgG1 AXL-183- N52Q	IgG1- AXL- 511	IgG1- AXL- 613	IgG1-AXL- 726-M101L	IgG 1- 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

Cultivo celular

25 Las células LCLC-103H (cáncer de pulmón humano de células grandes) y células A431 (DMSZ, Braunschweig,

Alemania) se cultivaron en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; Núm. de cat. BE12-115F) con un suplemento de suero de ternera Cosmic Calf Serum 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 estreptomicina 50 µg/mL (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 bovino Donor Bovine Serum 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 MEM (Life Technologies Núm. 11140). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5% (vol/vol). 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 pasaron 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

Se prepararon diluciones seriadas (concentraciones finales que varían 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 100% de destrucción de células tumorales. Las células no tratadas se utilizaron como referencia para 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 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™ de color blanco 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 de multiplacas EnVision (Envision, Perkin Elmer).

Los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE indujeron destrucción celular de 50% en células LCLC-103H a concentraciones entre 0,004 y 0,219 µg/mL como se muestra en la **Tabla 12** y la **Figura 7**.

Del mismo modo, los ADC contra AXL indujeron eficazmente citotoxicidad en células A431 (**Tabla 13**) y **Figura 15A**) y células MDA-MB231 (**Tabla 13** y **Figura 15B**).

Tabla 12 - 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-AXL-733-vcMMAE	0.219

Tabla 13. Citotoxicidad de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en células A431 y MDA-MB-231 (valores de 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

ADC	CE50 (µg/mL)			
	A431 (n = 3)		MDA-MB231 (n = 2)	
	Media	d.t.	Media	d.t.
IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE	1,157	0,160	0,139	0,028
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

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 por vía subcutánea 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 en el flanco derecho de ratones SCID hembra. Comenzando 14-21 días después de la inoculación de 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 calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

El panel de anticuerpos anti-AXL-vcMMAE mostró una amplia gama de actividad antitumoral en tumores SCLCLC-103H 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 indujeron inhibición del crecimiento tumoral, y los clones IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE no mostraron o mostraron solo inhibición leve del crecimiento tumoral.

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 frente a IgG1-b12 de control) indicó una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) en el volumen tumoral entre IgG1-b12 frente a 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.

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 pacientes de xenoinjerto derivado de pacientes con cáncer de páncreas y cáncer cervical.

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

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: animales con un tumor con un volumen entre 50 y 250 mm^3 , preferiblemente $80 - 200 \text{ mm}^3$, se distribuyeron 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 dosis de 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 calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

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 hidrogeno-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 un conjunto 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), la HRP se visualizó 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 un cubreobjetos en glicergel. Los cortes de tejido inmunoteñidos se digitalizaron en un microscopio manual Zeiss (AxioSkop) con aumentos 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 en color gris claro.

La **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 una IgG (IgG1-b12) de control de isotipo ($p < 0,001$; 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**). El IgG1-AXL-148-vcMMAE conjugado, sin embargo, indujo actividad antitumoral dependiente de la dosis en este modelo (**Figura 10B**), ilustrando que la capacidad terapéutica de los ADC contra AXL depende de la actividad citotóxica de MMAE.

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

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 de AXL quiméricos de humano-ratón. Se incluyó el anticuerpo monoclonal AXL que presenta reacción cruzada de 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 con sus homólogos murinos. La unión de 1 µg/mL de anticuerpo anti-AXL a las quimeras de AXL de ratón humano se determinó mediante citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 2.

Todos los anticuerpos anti-AXL mostraron unión a AXL humana (**Figura 11A**), mientras que la unión se anuló cuando el ECD de AXL humano se reemplazó por su homólogo murino (**Figura 11B**). Como era de esperar, el anticuerpo monoclonal contra AXL que presenta reacción cruzada de humano-ratón 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 fuerte reducción de la unión 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 se vio afectada. El anticuerpo monoclonal contra AXL que presenta reacción cruzada de humano-ratón YW327.6S2 mostró unión a todas las variantes quiméricas de AXL, confirmando la expresión adecuada de estas proteínas.

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 probó si la unión de los anticuerpos contra AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 o IgG1-AXL-613 interfería con la unión del ligando de AXL Gas6 a AXL. Por lo tanto, la unión de Gas6 a las células A431 que se habían incubado previamente con anticuerpos contra AXL de 10 µg/mL se probó como se describe en el Ejemplo 2. Antes de la incubación con el anticuerpo contra AXL YW327.6S2, que se describió que competía con Gas6 por la unión a AXL, se incluyeron como controles 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 14** 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 los controles de IgG1-b12 y medio. Esto ilustra que la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 a AXL no interfiere con 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 de IgG1-b12 y medio.

En los experimentos en los que las células A431 se preincubaron con Gas6, los valores máximos de unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 fueron comparables a la unión de anticuerpos en ausencia de Gas6 (la unión máxima después de la preincubación de Gas6 fue 91-108% de unión sin preincubación con Gas6) (**Tabla 14**). Los valores a CE₅₀ para la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 con o sin preincubación de Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo más altos después de la preincubación con Gas6 (**Tabla 14**), ilustrando que IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 no compiten con la unión a Gas6.

De un modo 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 de Gas6 fue de 40-43% de unión sin preincubación con Gas6; **Tabla 14**). 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 14**). 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 14

Anticuerpo	Anticuerpo que se une a las células A431			Gas6 vinculante a las células A431	
	CE ₅₀ sin Gas6 CE50 (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

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

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

Producción de gas6 de células tumorales A431 y LCLC-103H

Se probó 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 el ELISA Quantikine Human Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza la técnica cuantitativa de ELISA sándwich. Un Ab monoclonal específico para Gas6 humana se aplica como recubrimiento previamente sobre una microplaca. Los patrones y las muestras se pipeteen en los pocillos y cualquier Gas6 humano presente está unido por el Ab inmovilizado. Después de eliminar cualquier sustancia no unida, se añade a los pocillos un Ab policlonal ligado a enzima específico para Gas6 humana. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo de Ab-enzima no unido, se añade un sustrato a los pocillos y se

desarrolla el color en proporción a la cantidad de Gas6 humana unida 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 con células A431 contenía 2576 ng/mL de Gas6, mientras que la concentración de Gas6 en medio acondicionado con células LCLC-103H era más de 20 veces menor. (Tabla 15).

Tabla 15 - Producción de gas6 en medio condicionado de células tumorales.

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

Actividad antitumoral de los ADC contra AXL *in vivo*

Se determinó la actividad antitumoral *in vivo* de IgG1-AXL-061-vcMMAE (aglutinante de Ig1), IgG1-AXL-107-vcMMAE (aglutinante de Ig1), IgG1-AXL-137-vcMMAE (aglutinante de Ig1), IgG1-AXL-148-vcMMAE (aglutinante de Ig2), IgG1-AXL-183-vcMMAE (aglutinante de FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (aglutinante de FN2) en el modelo tumoral A431 (carcinoma epidermoide), que produce altos niveles de Gas6 y el modelo de tumor LCLC-103H (carcinoma de pulmón de células grandes), que produce bajos niveles de Gas6.

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 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 calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

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.

La Figura 13B muestra que el tratamiento de ratones con IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE (aglutinante de FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (aglutinante 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.

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 regresión tumoral 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).

En resumen, todos los ADC contra AXL 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 ADC contra AXL que no competían con el ligando de AXL Gas6.

Ejemplo 14: Expresión de AXL en diferentes indicaciones tumorales

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

Los portaobjetos de matrices tumorales FFPE se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígeno (pH 6) y la peroxidasa endógena se agotó mediante incubación con H_2O_2 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 $\mu\text{g/mL}$ 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-bencidina (DAB; color pardo; 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 conejo con

amino-etil carbazol (AEC; color rojo; Vector, SK4200). Los núcleos en las TMA se visualizaron con hematoxilina (color azul).

Las TMA inmunoteñidas con AXL y citoqueratina se digitalizaron con un escáner para portaobjetos Aperio con un aumento 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 positivas para AXL, 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 calificó manualmente. La intensidad de tinción de AXL se calificó como débil (1+), moderada (2+) o fuerte (3+) y el porcentaje de células de melanoma positivas para AXL se calificó 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, pancreático, cervical y endometrial. La **Tabla 16** muestra el porcentaje de núcleos tumorales que mostraron expresión de AXL en más de 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 tejido tumoral.

Tabla 16

Indicación tumoral	Subtipo	% de núcleos tumorales (pacientes) con >10% de células tumorales AXL positivas
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 (CPNM)	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 uterino	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; SLCL, cáncer de pulmón de células pequeñas; TNBC, cáncer de mama triple negativo

Ejemplo 15: los anticuerpos contra AXL se unen específicamente a AXL pero no a otros miembros de la familia de receptores TAM.

Expresión de AXL, MER y TYRO3 humanos en células HEK-293F

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de varias proteínas de longitud completa: AXL humana (Homo sapiens) (número de acceso Genbank NP_068713.2), MER humano (número de acceso Genbank EAW52096.1 y TYRO3 humano (acceso Genbank Q06418.1). Las construcciones

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

Las células Freestyle™ 293-F (un subclón 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 crecieron por 24-48 horas.

Estudio vinculante de anticuerpos contra AXL contra AXL humana, MER humano o TYRO3 humano

Las células HEK-293F transfectadas transitoriamente con construcciones de expresión para AXL, MER o TYRO3 humano de longitud completa se evaluaron para la unión de anticuerpos HuMab contra AXL mediante citometría de flujo. Las células HEK-293F transfectadas se incubaron con diluciones seriadas de anticuerpos contra AXL (diluciones de 4 veces; 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 IgG de cabra antihumano conjugada con R-ficoeritrina (PE) F(ab')₂ (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 PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). La tinción con ratón anti-humano Mer (R&D Systems, cat. Mab8912) y ratón antihumano Tyro3 (Dtk) (R&D Systems, cat. MAB859) se incluyeron como controles para la expresión, IgG1-b12 se incluyó como un isotipo no vinculante control de anticuerpos. 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 18A muestra que los anticuerpos HuMab contra AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresan AXL humana. Por el contrario, no hay unión de los anticuerpos HuMab contra AXL a las células que expresan MER (**Figura 18B**) o TYRO3 (**Figura 18C**) o a células HEK293 no transfectadas (**Figura 18D**) fue observado. La tinción con anticuerpos específicos para MER y Tyro3 confirmó que las células transfectadas mostraron una expresión adecuada de MER (**Figura 18F**) o TYRO3 (**Figura 18G**), respectivamente.

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

Internalización de HuMab contra AXL unidos a la superficie celular evaluada mediante citometría de flujo

La internalización de los anticuerpos HuMab contra AXL unidos a la superficie celular contra las células MDA-MB-231 y Calu-1 (línea celular de carcinoma de pulmón humano; ATCC, número de cat. HTB-54) se evaluó mediante citometría de flujo. Se sembraron 50.000 células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se dejaron unir durante 6 horas a 37°C. Las placas se incubaron a 4°C durante 30 minutos antes de la incubación con diluciones seriadas 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. Posteriormente, las células se separaron con 40 µL de solución de tripsina caliente, se lavaron con PBS helado/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con anti-cabra conjugada con R-ficoeritrina (PE) IgG humana F(ab')₂ (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 en 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 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 19 muestra que, para todos los anticuerpos HuMab contra AXL y a todas las concentraciones probadas, se detectó más anticuerpo en 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 y degradación intracelular de Fab-TAMRA/QSY7

La internalización de los anticuerpos contra AXL se evaluó en el ensayo de internalización de Fab-TAMRA/QSY7. Este ensayo utiliza un par de fluoróforos (TAMRA) y de extintor (QSY7). En íntima proximidad, por ejemplo, tras la conjugación con la misma proteína, QSY7 extingue la fluorescencia de TAMRA. En este ejemplo, los fragmentos Fab de anti-IgG humano de cabra (Jackson ImmunoResearch) se conjugaron con TAMRA/QSY7 (Fab-TAMRA/QSY7) como describen (Ogawa *et al.*, Mol Pharm 2009; 6(2):386-395), y 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 des-extinción de TAMRA. La fluorescencia TAMRA de 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 **Figura 20**, La intensidad de fluorescencia de las células LCLC-103H se potenció tras la incubación con el complejo AXL-anticuerpo-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 ADC contra AXL en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente con cáncer de esófago (PDX)

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE (también denominado "HuMax-AXL-ADC" en la presente memoria) se evaluó en el modelo de PDX esofágico subcutáneo ESO195 en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c (experimentos realizados por Crown Bioscience, Taicang Provincia de Jiangsu, China). Se utilizaron fragmentos tumorales de ratones donantes que portaban xenoinjertos de esófago derivados del paciente (ESO195) 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 tumoral (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: animales con 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 grupal. 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 monitorizaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibrador (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 ESO195 en comparación con los grupos de control IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE (p <0,001 el día 23, prueba ANOVA de una vía). El tratamiento de los ratones con ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que ilustra que la capacidad terapéutica de ADC contra AXL 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 ADC contra AXL en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con cáncer cervical

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 del paciente CEXF 773 en ratones NMRI nu/nu (Harlan, Países Bajos). Los experimentos fueron realizados por Oncotest (Friburgo, Alemania).

Se obtuvieron fragmentos tumorales de xenoinjertos en pases 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 con 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 grupal. 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 monitorizaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibrador (PLEXX) como: 0,52 x (largo) x (ancho)².

La **Figura 22** muestra que el tratamiento de 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 IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE. El tratamiento de ratones con ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que ilustra que la capacidad terapéutica de ADC contra AXL 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.

Ejemplo 19: Eficacia antitumoral de los ADC contra AXL en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ortotópico

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

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 (CB-17/lcrPrkdc-scid/CRL) hembra 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 monitorizaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

La **Figura 23** muestra que el tratamiento de los 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 ratones con ADC IgG1-b12-vcMMAE no dirigido no mostró actividad antitumoral en este modelo, lo que demuestra que la capacidad terapéutica de ADC contra AXL 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.

Ejemplo 20: La citotoxicidad in vitro inducida por productos conjugados de fármacos con anticuerpos específicos de AXL depende de la expresión de la diana

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

Cultivo celular

Las células LS174T (línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano; ATCC, Núm. de cat. CL-188) se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) con Glutamax, Hepes y Rojo Fenol (Life Technologies, Núm. de cat. 42360-024). Los componentes son Donor Bovine Serum con hierro al 10% (DBSI) (Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y piruvato de sodio al 1% (100 mM; Lonza, Núm. de cat. BE13-115E) y penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

Las 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 humanas; ATCC, Núm. de cat. HTB-183) y células NCI-H1299 (cáncer de pulmón de células no pequeñas humano; ATCC, Núm. de cat. CRL-5803) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Modificación ATCC; Life Technologies, Núm. de cat. A10491-01). Los componentes son Donor Bovine Serum con Hierro al 10% (DBSI; Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

Las células SKOV-3 (adenocarcinoma de ovario humano; ATCC, Núm. de cat. HTB-77) se cultivaron en Medio 5A de McCoy con L-glutamina y HEPES (Lonza, Núm. de cat. BE12-168F). Los componentes son Donor Bovine Serum con hierro al 10% (DBSI; Life Technologies, Núm. de cat. 10371-029) y penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E).

Las células Calu-1 (carcinoma epidermoide de pulmón humano; ATCC, Núm. de cat. HTB-54) se cultivaron en medio 5A de McCoy con Catopeptona, sin HEPES (Life Technologies, Núm. de cat. 26600-023). Los componentes son Donor Bovine Serum 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 penicilina al 1%/Estreptomicina (Lonza, Núm. de cat. DE17-603E). Las células Calu-1 son resistentes a la terapia dirigida a EGFR.

Se cultivaron células LCLC-103H (cáncer de pulmón de células grandes humanas), 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 en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas

La expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se evaluó por inmunofluorescencia indirecta utilizando QIFIKIT (DAKO, Núm. de cat. K0078) con anticuerpo monoclonal de ratón Z49M (biotecnología de Santa Cruz, Núm. de cat. sc-73719). Las células adherentes se trataron con tripsina y se pasaron 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. Los siguientes pasos se realizaron en 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 cuentas de configuración y calibración se añadieron a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las cuentas 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 cuentas 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 citométrica de las células viables. La intensidad de fluorescencia media de las cuentas 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, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas de AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó 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 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 alta expresión de AXL, mientras que la citotoxicidad fue baja o ausente en 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.

Ejemplo 21 - Eficacia antitumoral mejorada de IgG1-AXL-107-vcMMAE combinado con erlotinib en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de NSCLC.

Modelo de PDX LU2511

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo subcutáneo de PDX de NSCLC resistente a erlotinib LU2511 en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c (experimentos realizados por Crown Bioscience, distrito de Changping, Beijing, China). Se utilizaron fragmentos tumorales de ratones donantes que portaban xenoinjertos de NSCLC derivados de paciente (LU2511) para su inoculación en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c. A cada ratón se le inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho un fragmento tumoral (2-3 mm de diámetro) y se permitió que los tumores crecieran hasta que el volumen tumoral fuera de aproximadamente 200 mm³. La aleatorización de los animales se realizó de la siguiente manera: los animales que portaban un tumor con un volumen de aproximadamente 200 mm³ se distribuyeron en 5 grupos experimentales (8 animales por grupo), considerando una mediana y una media comparables del volumen tumoral grupal. Los grupos de tratamiento fueron: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib y erlotinib más IgG1-AXL-107-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. Las dosis de erlotinib se administraron por vía oral (per os) a 50 mg/kg diariamente durante 2 semanas. Los volúmenes tumorales (mm³) se verificaron dos veces por semana y se calcularon a partir de las mediciones del calibrador (PLEXX) como: $0,5 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$.

La **Figura 25** muestra que el tratamiento de ratones con erlotinib no indujo actividad antitumoral, lo que se esperaba. IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la inhibición del crecimiento tumoral de los tumores LU2511 en comparación con los grupos de control IgG1-b12 ($p < 0,01$ el día 10, prueba ANOVA de una vía; **Figura 25B**) e IgG1-b12-MMAE ($p < 0,05$ el día 10, prueba ANOVA de una vía; **Figura 25B**). El tratamiento de ratones con la combinación de IgG1-AXL-107-

vcMMAE y erlotinib indujo una actividad antitumoral más potente que IgG1-AXL-107-vcMMAE solo en este modelo ($p < 0,05$ el día 17, prueba ANOVA de una vía; **Figura 25C**).

Modelo de PDX LU0858

Se evaluó la actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de PDX de NSCLC resistente a erlotinib subcutáneo LU0858 en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c (experimentos realizados por CrownBioscience, distrito de Changping, Beijing, China). La inoculación de fragmentos tumorales a ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c y la aleatorización se realizó como se describió anteriormente.

El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) se realizó los días 0 y 7 después de la aleatorización de los grupos (**Figura 32**). También se probó el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE combinado con el inhibidor de EGFR erlotinib. Erlotinib se administró diariamente durante 14 días a una dosis de 50 mg/kg. Erlotinib solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 se utilizaron como controles. Erlotinib solo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. A 2 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE solo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. A 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE solo indujo la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el control IgG1-b12-vcMMAE. La combinación de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE con erlotinib no mejoró el resultado frente a IgG1-AXL-107-vcMMAE solo (**Figura 32**). La adición de erlotinib al tratamiento con 2 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE condujo a una inhibición del crecimiento similar a la del grupo que recibió 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Modelo de PDX LU1868

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de PDX de NSCLC resistente a erlotinib subcutáneo LU1858 en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c (experimentos realizados por CrownBioscience, Changping District, Beijing, China). La inoculación de fragmentos tumorales a ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c y la aleatorización se realizó como se describió anteriormente.

El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) se realizó los días 0 y 7 después de la aleatorización de los grupos. También se probó el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE combinado con el inhibidor de EGFR erlotinib. Erlotinib se administró diariamente durante 14 días a una dosis de 50 mg/kg. Los tratamientos con erlotinib solo, IgG1-b12-vcMMAE o IgG1-b12 se incluyeron como controles (**Figura 33**).

El análisis mediante la prueba de Mann-Whitney se realizó el día 21 para comparar los efectos del tratamiento frente a IgG1-b12 o IgG1-b12-vcMMAE, el día 28 para comparar los efectos de IgG1-AXL-107-vcMMAE a 2 mg/kg solo frente a IgG1-AXL-107-vcMMAE a 2 mg/kg combinado con erlotinib, y el día 31 para comparar los efectos de IgG1-AXL-107-vcMMAE a 4 mg/kg solo frente a IgG1-AXL-107-vcMMAE a 4 mg/kg combinado con erlotinib. Erlotinib solo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. A 2 mg/kg y 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE solo indujo la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que la combinación de IgG1-AXL-107-vcMMAE con erlotinib no mejoró el resultado frente a IgG1-AXL-107-vcMMAE solo (**Figura 33**).

Modelo de PDX LXFA 526

Se evaluó la actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de PDX de NSCLC resistente a erlotinib subcutáneo LXFA 526 (experimentos realizados por Oncotest, Friburgo, Alemania). La inoculación de fragmentos tumorales a ratones nu/nu NMRI macho de 4-6 semanas de edad y la aleatorización se realizó como se describió anteriormente.

El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) se realizó los días 0 y 7 después de la aleatorización de los grupos (**Figura 34**). También se probó el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE combinado con el inhibidor de EGFR erlotinib. Erlotinib se administró diariamente durante 14 días a una dosis de 50 mg/kg. Erlotinib solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 se utilizaron como control. Erlotinib solo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la inhibición del crecimiento tumoral a una dosis de 2 mg/kg, mientras que a una dosis de 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una regresión tumoral completa en todos los ratones al menos hasta el día 76. El tratamiento combinado de IgG1-AXL-107-vcMMAE a niveles de dosis de 2 mg/kg o 4 mg/kg con erlotinib mostró una actividad antitumoral similar en comparación con IgG1-AXL-107-vcMMAE solo (**Figura 34**).

Modelos de PDX LXFA 677 y LXFA 677_3

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de PDX de NSCLC subcutáneo LXFA 677 y el modelo LXFA 677_3, que se obtiene a partir del modelo LXFA 677 y ha adquirido resistencia al erlotinib (experimentos realizados por Oncotest, Freiburg, Alemania). La inoculación de fragmentos tumorales a ratones nu/nu NMRI macho de 4-6 semanas de edad y la aleatorización se realizó como se describió anteriormente.

El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) se realizó los días 0 y 7 después de la aleatorización de los

grupos. También se probó el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE combinado con el inhibidor de EGFR erlotinib. Erlotinib se administró diariamente durante 14 días a una dosis de 50 mg/kg. Erlotinib solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 se utilizaron como controles. Erlotinib indujo una regresión tumoral parcial en el modelo LXFA 677 pero no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral en el modelo LXFA 677_3 resistente a erlotinib, como se esperaba (**Figura 35**). IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la inhibición del crecimiento tumoral a una dosis de 2 mg/kg, mientras que a una dosis de 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la regresión tumoral parcial en el modelo LXFA 677. En el modelo LXFA 677_3 resistente a erlotinib, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una regresión tumoral completa en ambos niveles de dosis, que duró al menos hasta el día 41. En los dos modelos, el tratamiento combinado de IgG1-AXL-107-vcMMAE a 4 mg/kg así como a 2 mg/kg con erlotinib indujeron una actividad antitumoral similar en comparación con IgG1-AXL-107-vcMMAE solo (**Figura 35**).

Tabla 17. Descripción general de los modelos de PDX de pulmón, estado mutacional de EGFR y respuesta a erlotinib y ADC contra AXL.

Modelo	Estado de EGFR	Resistencia a erlotinib
LU2511 ^a	WT	R
LU0858 ^b	L858R	R
LU1868 ^b	T790M/L858R	R
LXFA526	WT	R
LXFA677 ^c	WT	sensible
LXFA677_res3 ^c	WT	R

^a Yang et al. EORTC meeting 2013, Poster 493 (2013)
^b Yang et al. Int. J. Cáncer: 132, E74-E84 (2013)
^c Tschuch et al. AACR-EORTC meeting 2015, Poster A10 (2015)

Ejemplo 22 - Las líneas celulares de NSCLC que son resistentes a los inhibidores de EGFR erlotinib, gefitinib y afatinib muestran una potenciación de la expresión de la proteína Axl y una potenciación de la sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE in vitro

La influencia de la resistencia adquirida a erlotinib en la expresión de la proteína Axl en un panel de líneas celulares de NSCLC se evaluó mediante análisis de transferencia Western. Además, las líneas celulares de NSCLC fueron evaluadas por su sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE *in vitro*

Cultivo celular y agentes anticancerosos

Todos los materiales de cultivo de tejidos se obtuvieron de Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). La línea celular de adenocarcinoma de NSCLC sensible a erlotinib HCC827 se adquirió de la ATCC. Las células HCC827 son KRAS de tipo salvaje y albergan la mutación exon19del en EGFR (deleción de E746 - A750), que está asociada con la sensibilidad a TKI de EGFR. Las células se cultivaron en medio Glutamax RPMI-1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (FBS) y penicilina-estreptomicina 50 µg/mL y se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Los inhibidores de EGFR (erlotinib, gefitinib y afatinib) se adquirieron a Selleck Chemicals (Houston, TX). Erlotinib y gefitinib se disolvieron en DMSO, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Análisis de repeticiones cortas en tándem

Para confirmar la autenticidad de la línea celular, se realizó un análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) utilizando el sistema Cell ID™ (cat. G9500, Promega, Madison, EE.UU) según lo descrito por el fabricante. En resumen, se amplificaron mediante PCR diez loci específicos del genoma humano y se analizaron por electroforesis capilar. Los autores de la presente invención encontraron que ER10, ER20 y ER30 tenían los mismos tamaños alélicos en los diez loci que el clon HCC827 parental. También encontraron que los tamaños de los loci alélicos son idénticos a los publicados por la ATCC.

Purificación de ADN y pruebas de mutación EGFR/KRAS

El ADN se extrajo de las células utilizando el Mini Kit QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Alemania), y el estado de mutación EGFR y KRAS se examinó utilizando el kit TheraScreen EGFR RGQ PCR y los kits TheraScreen KRAS RGQ PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) como se describe por el fabricante.

Ensayo de citotoxicidad in vitro para evaluar la sensibilidad de la línea celular a erlotinib o a ADC contra AXL

Se sembraron 2000 células/pocillo (5000 células en el caso de ER20) en placas de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran durante 6-8 h antes de añadir erlotinib, gefitinib, afatinib, IgG1-AXL-107-vcMMAE o el ADC de control de isotipo IgG1-b12-vcMMAE; a continuación, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días y se cuantificaron mediante Cell Titer Glo Assay (como se describe en el Ejemplo 8). Las células no tratadas se utilizaron como referencia para 100% de crecimiento celular. Las placas se incubaron durante 4 o 5 días a 37°C, 5% de CO₂. El ensayo con cristal violeta se realizó añadiendo solución de tinción durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavando las células dos veces en H₂O, redisolviendo en tampón de citrato de Na (29,41 g de citrato de Na en EtOH al 50%) y midiendo la absorbancia a 570 nm.

Generación de líneas celulares de NSCLC resistentes a erlotinib o gefitinib

Se generaron tres líneas celulares isogénicas resistentes a erlotinib a partir de la línea celular HCC827, mediante exposición continua a erlotinib. Las células se expusieron inicialmente a erlotinib 1 µM, y la concentración de erlotinib se incrementó gradualmente a 20 µM o 30 µM, respectivamente, durante un curso de seis meses. Una vez que las líneas celulares habían adquirido resistencia a erlotinib, se cultivaron en medio de cultivo como se describió anteriormente, con un suplemento de erlotinib 20 µM o 30 µM.

De manera similar, se generaron una línea celular isogénica resistente a erlotinib y 5 líneas celulares resistentes a gefitinib a partir de la línea celular PC9, mediante exposición continua a erlotinib o gefitinib. Las células se expusieron inicialmente a erlotinib o gefitinib 1 µM, y la concentración de TKI se incrementó gradualmente hasta 30 µM en el transcurso de seis meses.

Transferencia Western

La expresión de Axl se determinó mediante análisis de transferencia Western. La activación de Axl se determinó midiendo la fosforilación utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. Las células se lavaron en TBS helado, se centrifugaron y se lisaron en tampón RIPA (Tris HCl 10 mM de pH 8, Na₂EDTA 5 mM de pH 8, NP-40 al 1%, dioxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%), que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa (Complete Mini PhosphoSTOP, Roche, Basilea, Suiza). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de proteínas BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se resolvieron 5-40 µg de proteína en geles RunBlue SDS-PAGE al 4-12% (Expedeon, San Diego, CA), se transfirieron a la membrana PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Dinamarca), se bloquearon y a continuación se incubaron con anticuerpos primarios O/N a 4°C. El anticuerpo anti-actina se adquirió a Abcam (Núm. de cat. Ab8226) y el anticuerpo contra AXL total se adquirió a R&D Systems (Núm. de cat. AF154). A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo, cabra anti-ratón (Dako, Dinamarca) o burro anti-cabra (Santa Cruz) conjugados con HRP en dilución 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron con el Reactivo de Detección de Transferencia Western ECL Prime de Amersham (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y se expusieron a una película CL-Xposure (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

Resultados

La línea celular de tipo salvaje HCC827 era altamente sensible al tratamiento con erlotinib, con una CI₅₀ de aproximadamente 0,005 µM. Las líneas celulares resistentes a erlotinib ER10, ER20 y ER30, que fueron generadas por la exposición a concentraciones crecientes de erlotinib durante seis meses, no fueron sensibles a erlotinib (CI₅₀ > 50 µM) (**Tabla 18**). La estabilidad del fenotipo resistente a erlotinib se confirmó cultivando las líneas celulares ER10, ER20 y ER30 en ausencia de erlotinib durante seis semanas. Después de las seis semanas, las líneas celulares mostraron el mismo nivel de resistencia al erlotinib. El estado mutacional de EGFR y KRAS de las líneas celulares resistentes a erlotinib se mantuvo sin cambios en comparación con la línea celular parental (**Tabla 18**). La expresión de la proteína Axl se reguló en las líneas celulares derivadas de HCC827 que habían adquirido resistencia a erlotinib. (**Figura 26A**). La regulación por incremento de Axl se conservó cuando las líneas celulares se cultivaron en ausencia de erlotinib (**Figura 26A**).

Del mismo modo, la expresión de la proteína Axl se reguló en las líneas celulares derivadas de PC9 que habían adquirido resistencia a erlotinib o gefitinib (**Figura 26B**).

Tabla 18. Características de la línea celular parental HCC827 y las líneas celulares derivadas resistentes a erlotinib.

	HCC827-wt	HCC827-ER10	HCC827-ER20	HCC827-ER30
Sensibilidad a erlotinib	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
CI ₅₀	0,005 µM	> 50 µM	> 50 µM	> 50 µM
Expuesto a conc. de erlotinib	0 µM	10 µM	20 µM	30 µM

	HCC827-wt	HCC827-ER10	HCC827-ER20	HCC827-ER30
Estado EGFR	Exon19del	Exon19del	Exon19del	Exon19del
Estado KRAS	wt	Wt	wt	Wt

Se evaluó la sensibilidad de las células HCC827 y PC9 resistentes a erlotinib/gefitinib de tipo salvaje a IgG1-AXL-107-vcMMAE. Por lo tanto, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de IgG1-AXL-107-vcMMAE (intervalo 10 µg/mL – 3,8 x 10⁻⁵ µg/mL) durante 5 días, después de los cuales se determinó la viabilidad celular. La **Figura 27A y B** muestran que las células HCC827 y PC9 de tipo salvaje son insensibles al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27F y J**), pero muestran una fuerte reducción de la viabilidad tras el tratamiento con inhibidores de EGFR (**Figura 27C e I**). Las líneas celulares HCC827-ER20 y HCC827-ER30, con resistencia adquirida a erlotinib para TKI de EGFR, también fueron resistentes a gefitinib y afatinib para las TKI de EGFR (**Figura 27D y E**) pero mostraron una reducción de la viabilidad tras el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27A**). La línea celular PC9-ER con resistencia adquirida a erlotinib para TKI de EGFR (**Figura 27I**) también mostró una reducción de la viabilidad tras el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27B y K**). El tratamiento con el ADC de control, IgG1-b12-vcMMAE, no afectó a la viabilidad celular hasta concentraciones de 10 µg/mL en ninguna de las líneas celulares analizadas. (**Figura 27F, G, H, J y K**).

Ejemplo 23 - La resistencia al inhibidor de BRAF PLX4720 está asociada con la expresión de la proteína Axl regulada por incremento y una mayor sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE

En un panel de líneas celulares de melanoma humano (CDX) establecidas y líneas celulares de melanoma con pocos pases derivadas de pacientes (PDX), se evaluó la expresión de la proteína Axl y la sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE con relación a su resistencia intrínseca o adquirida a la inhibición del crecimiento mediante tratamiento con el inhibidor de BRAF PLX4720, un análogo del inhibidor de BRAF clínicamente aprobado vemurafenib.

Cultivo celular

SKMEL147 se obtuvo del Laboratorio de Reuven Agami en el Instituto Holandés del Cáncer. A875 se obtuvo de Thermo Fischer, COLO679 de Sigma, SKMEL28 y las células A375 de la ATCC. Las líneas celulares de melanoma se cultivaron en DMEM con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (Sigma), 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomycin (todos de Gibco). Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% (vol/vol) humidificada.

Generación de líneas celulares resistentes a PLX4720

Las líneas celulares sensibles al inhibidor de BRAF (SKMEL28 y A375) se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de BRAF PLX4720 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE.UU, Company: Selleck Chemicals, Houston, TX, EE.UU, Número de cat.: S1152) hasta 3 µM para establecer las correspondientes SKMEL28R y A375R resistentes a PLX4720. Todas las líneas celulares resistentes al fármaco se cultivaron permanentemente en presencia de 3 µM de PLX4720.

Generación de líneas celulares de melanoma con pocos pases derivadas de pacientes (PDX)

La Junta de Ética Médica del hospital Antoni van Leeuwenhoek, Instituto Holandés del Cáncer, aprobó la recolección y el uso de tejido humano. Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de experimentación con animales del instituto y se realizaron de acuerdo con las normas y reglamentos aplicables. Se obtuvo material tumoral humano durante la cirugía, o tomando biopsias tumorales de pacientes con melanoma maligno utilizando una aguja de calibre 14. Se utilizaron fragmentos tumorales de ~5 mm³ para la implantación subcutánea en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, que se realizó bajo anestesia. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana con un calibrador. Antes de alcanzar un tamaño tumoral de 1000 mm³, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se disociaron las piezas tumorales en suspensiones de células individuales, se colocaron en placas en placas de 10 cm y se cultivaron como cultivos celulares primarios en DMEM + FBS al 10% (Sigma) + 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomycin (todo Gibco).

Análisis de Transferencia Western

La expresión de Axl y MITF se determinó utilizando análisis de transferencia Western. Las proteínas en el producto lisado celular se separaron en un gel SDS-PAGE al 4-12% y se transfirieron a una membrana PVDF que posteriormente se tiñó con un anticuerpo específico para Axl (sc-1096 Santa Cruz) en BSA al 5% en PBS-Tween, o una membrana de nitrocelulosa teñida con MITF (ab12039 Abcam) en leche en polvo sin grasa al 5% en PBS-Tween. Para controlar la carga de gel, se utilizaron anticuerpos contra vinculina o beta-actina.

Cuantificación de la expresión de AXL en la membrana plasmática de las líneas celulares de melanoma

La expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se cuantificó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando análisis QIFIKIT (DAKO, Núm. de cat. K0078). Axl se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón ab89224 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las células adherentes se trataron con tripsina y se pasaron 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. Los siguientes pasos se realizaron en 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 (número de cat. QF2040741, número de lote MA1-10406, Pierce) a una concentración de 10 μ g/mL. Después de una incubación de 30 minutos a 4°C, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 150 μ L de tampón FACS (PBS que contenía BSA al 0,1%). Las cuentas de configuración y calibración se añadieron a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las cuentas en paralelo se lavaron dos veces más con 150 μ L de tampón FACS y se resuspendieron en 50 μ L de IgG de cabra anti-ratón conjugada 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 cuentas 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 Calibur (BD Biosciences) registrando 10.000 eventos dentro de la ventana citométrica de células viables. La intensidad de fluorescencia media de las cuentas 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, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó 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).

Citotoxicidad *in vitro*

Las células se cultivaron hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se trataron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, Núm. de cat. 352340) para obtener suspensiones de células individuales. Las células se sembraron en placas en un formato de 96 pocillos utilizando las siguientes densidades de siembra: 2000 células/pocillo para líneas celulares establecidas, 4000 células/pocillo para líneas celulares derivadas de PDX. Se añadió IgG1-AXL-107-vcMMAE 4 horas después de la siembra. Se prepararon diluciones seriadas (1:10; concentraciones finales que varían de 0,0001 a 10 μ g/mL) de IgG1-AXL-107-vcMMAE en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Después de 5 días (para muestras de CD) u 8 días (muestras de PDX) de incubación a 37°C, 5% de CO₂, se añadió el reactivo CellTiter-Glo (Promega; Núm. de cat. G7571) a los pocillos y se realizó el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia se midió con el lector de microplacas Infinite M200 (Tecan) y la viabilidad se calculó de la siguiente manera: % de viabilidad = (luminiscencia de la muestra de interés - luminiscencia PAO)/(promedio de luminiscencia de las tratadas con vehículo de control - luminiscencia PAO), representando PAO óxido de fenilarsina 5 μ M para 100% de destrucción celular.

Modelo de xenoinjerto de melanoma SKMEL147

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de melanoma subcutáneo SKMEL147 en ratones carentes de sistema inmunitario NMRI. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo células de melanoma SKMEL147 $2,5 \times 10^5$, que expresan altos niveles de Axl (véanse la Figura 28 y la Tabla 15), que se resuspendieron 1:1 en matrigel en un volumen total de 100 μ L. Los tumores se midieron tres veces por semana con un calibrador, y cuando los tumores tenían 100 mm³, los animales se aleatorizaron en los siguientes grupos de tratamiento: IgG1-b12 (4 mg/kg), IgG1-b12-vcMMAE (4 mg/kg), IgG1-107 (4 mg/kg), IgG1-107-vcMMAE (2 mg/kg) e IgG1-107-vcMMAE (4 mg/kg).

El día 12 y el día 19 después de la inyección de células tumorales (día 1 y día 8 de aleatorización) los compuestos de prueba se inyectaron en la vena de la cola de los animales en un volumen total de 100 μ L. Los animales fueron sacrificados cuando el tamaño del tumor excedió 1000 mm³.

Tratamiento de una población mixta de células SKMEL28 de tipo salvaje y células SKMEL28 resistentes a PLX4720

Las células SKMEL28 de tipo salvaje y las células SKMEL28 resistentes a PLX4720 (SKMEL28-R) se transfectaron con vectores de expresión de los fluoróforos mCherry (rojo) o GFP (verde), respectivamente. Posteriormente, las células se sembraron a una razón 1:1, con 50.000 células de cada línea celular en una placa de 6 pocillos (en total 100.000 células/pocillo). Después de 3 horas, se añadieron los siguientes compuestos a los pocillos: IgG1-AXL-107-vcMMAE (1 μ g/mL), IgG1-b12-MMAE (1 μ g/mL; ADC de control de isotipo), PLX4720 (10 μ M; inhibidor de BRAF),

dabrafenib (1 μ M; inhibidor de BRAF) o trametinib (0,1 μ M; inhibidor de MEK). Después de 4 días, las células se trataron con tripsina, se lavaron una vez en PBS + BSA al 1% y se analizaron mediante citometría de flujo.

Imunohistoquímica

La expresión de AXL se evaluó en tejidos completos (WT) embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) recién cortados con melanoma maligno. La tinción se realizó manualmente en Sequenza Slide Racks (Ted Pella Inc., Redding, CA, EEUU; Núm. de Cat. 36105).

Antes de la tinción, los portaobjetos de tejido FFPE se desparafinaron en xileno al 100% (Sigma-Aldrich, Núm. de Cat. 16446; tres veces, 5 min.) y se deshidrataron en etanol al 96% (Sigma Aldrich, Núm. de Cat. 32294; dos veces, 5 min.) a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la recuperación del antígeno. Los portaobjetos IHC se incubaron en tampón citrato (pH 6; DAKO; Núm. de Cat. S2369) durante 5 min. y se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena en tampón citrato/fosfato (ácido cítrico 0,43 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,35 M de pH 5,8) a temperatura ambiente durante 15 min. Los portaobjetos se incubaron en suero humano normal al 10% (CLB/Sanguin, Núm. de Cat. K1146) en PBS, antes de la incubación con anticuerpos primarios. La expresión de Axl se determinó mediante incubación con 3 μ g/mL de anticuerpo policlonal de conejo anti-Axl humano H-124 en PBS con un suplemento de suero humano normal al 2% a temperatura ambiente durante 60 minutos. Los portaobjetos se lavaron en PBS con un suplemento de Tween-20 al 0,1% (dos veces, 3 minutos) y se detectó la unión de anticuerpos de conejo específicos para Axl con poli-HRP-IgG anti-conejo Bright sin diluir. La HRP se visualizó con el cromóforo 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (color rojo; Sigma, Núm. de Cat. A6926-100TAB); los núcleos se contratiñeron con hematoxilina (DAKO, cat. no. S3309). Los portaobjetos fueron analizados por un patólogo certificado en el Netherlands Cancer Institute (NKI, Amsterdam, Países Bajos), quien calificó la intensidad y la localización de la tinción de Axl en cada muestra. Los ejemplos se muestran en la Figura 39.

Resultados

La expresión de AXL se evaluó en un panel de líneas celulares de melanoma establecidas (**Tabla 19**) y líneas de melanoma primario con pocos pases (PDX, **Tabla 20**). La expresión de AXL, según lo determinado por transferencia Western (**Figura 28**), se correlacionó inversamente con la expresión de MITF en las líneas celulares establecidas (**Figura 28A**) así como muestras clínicas derivadas de pacientes (**Figura 28B**). En el panel de líneas celulares establecidas, la expresión de Axl también se determinó mediante citometría de flujo cuantitativa. Un ejemplo de una línea celular negativa y positiva AXL se muestra en la **Figura 29**. Los niveles de expresión de Axl (expresados como ABC) para todas las líneas celulares se enumeran en la **Tabla 19**, junto con el estado de mutación de BRAF de las líneas celulares.

A continuación, se evaluó la sensibilidad de las líneas celulares de melanoma establecidas y el panel PDX a IgG1-AXL-107-vcMMAE en ensayos de viabilidad. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de IgG1-AXL-107-vcMMAE (intervalo 1×10^{-4} a 10 μ g/mL) durante 5 días después de los cuales se determinó la viabilidad celular. Los resultados se resumen en las **Tablas 19 y 20**, las curvas de dosis-respuesta se muestran en las **Figuras 30 y 31**. La **Figura 30** muestra que las 4 líneas celulares que expresan AXL (SKMEL147, A875, A375R, SKMEL28R), tres de las cuales eran resistentes a PLX4720, son sensibles al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Las dos líneas celulares negativas para AXL COLO679 y SKMEL28 no mostraron cambios en la viabilidad tras el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Se analizaron tres muestras de PDX resistentes a PLX4720 en ensayos de viabilidad con IgG1-AXL-107-vcMMAE. La **Figura 31** muestra que los dos cultivos PDX de alta expresión de AXL, MO16 y MO19R, fueron sensibles al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE, mientras que el cultivo de PDX de baja expresión de AXL M082 no mostró una respuesta diferente de la observada con el tratamiento de control con IgG1-b12-vcMMAE.

Tabla 19. Características del panel de la línea celular de melanoma.

Línea celular	Expresión de AXL (Transferencia western)	Expresión de AXL (FACS)	BRAF	NRAS	Sensibilidad a PLX4720	Sensibilidad a HuMax-AXL-ADC
		Número de receptor (ABC)				
SKMEL147	+	34981	wt	Q61R	resistente	Sensible
A875	+	37079	V600E	tipo salvaje	sensible	Sensible
COLO679	-	BLQ	V600E	Wt	no probado	Resistente
A375R	+	14228	V600E	Wt	resistente	Sensible
SKMEL28	-	BLQ	V600E	Wt	sensible	Resistente

Línea celular	Expresión de AXL (Transferencia western)	Expresión de AXL (FACS)	BRAF	NRAS	Sensibilidad a PLX4720	Sensibilidad a HuMax-AXL-ADC
		Número de receptor (ABC)				
SKMEL28R	+	63809	V600E	Wt	resistente	Sensible

* BLQ = Por debajo del Límite de Cuantificación (<3300, valor ABC más bajo de cuentas de calibración)

Tabla 20. Características de los cultivos de melanoma derivados de pacientes.

Nombre	Estado BRAF/NRAS	Expresión de AXL (Transferencia Western)	Número de receptores de expresión de AXL (ABC, FACS)	Sensibilidad a PLX4720	Sensibilidad a HuMax-AXL-ADC
M016	NRAS ^{Q61R}	+	13688	resistente	Sensible
M019R	BRAF ^{V600E}	++	25988	resistente	Sensible
M082	BRAF ^{V600E}	(bajo)	3376	resistente	Insensible

5 En el modelo de xenoinjerto de melanoma SKMEL147, los ratones tratados con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE o IgG1-AXL-107 no mostraron inhibición del crecimiento tumoral. IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo inhibición del crecimiento tumoral a 2 mg/kg, y a una dosis de 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una fuerte regresión tumoral, que duró hasta alrededor del día 50 (**Figura 36A**).

10 HuMax-AXL-ADC a una dosis de 4 mg/kg mostró un profundo efecto antitumoral, pero los tumores comenzaron a crecer nuevamente después del día 50. Cuatro ratones que mostraron rebrote del tumor después de la regresión inicial del tumor con 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE se volvieron a tratar con una dosis única de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE los días 55, mientras que para la comparación se observaron otros dos ratones.

15 La repetición del tratamiento con 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE dio como resultado una regresión tumoral en los cuatro ratones, mientras que los 2 ratones que se observaron mostraron crecimiento tumoral (**Figura 36B**). Dos de los cuatro ratones sometidos a repetición del tratamiento mostraron una regresión tumoral que permaneció al menos hasta el día 80, mientras que se observó el crecimiento tumoral alrededor del día 70 en los otros dos ratones sometidos a repetición del tratamiento. (**Figura 36B**).

20 En la población mixta de células SKMEL28 wt y células SKMEL28 resistentes a PLX4720, en comparación con el control no tratado, el número total de células se redujo en 74-62% cuando las mezclas celulares se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE, PLX4720 o dabrafenib (**Figura 37A**). El tratamiento de las mezclas celulares con las combinaciones de IgG1-AXL-107-vcMMAE y PLX4720, IgG1-AXL-107-vcMMAE y dabrafenib, dabrafenib y trametinib, o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una reducción de 81-92% del número total de células en comparación con las células no tratadas (**Figura 37A**).

30 Para evaluar si se erradicaron poblaciones celulares específicas, se determinó la razón de color verde (células SKMEL28-R positivas para GFP) y rojo (células SKMEL28 positivas para mCherry). Como se esperaba, la ausencia de tratamiento y el tratamiento con IgG1-b12-vcMMAE no afectaron la razón GFP/mCherry, ya que el número total de células tampoco se vio afectado (**Figura 37B**). El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE dio como resultado una razón GFP/mCherry muy reducida (**Figura 37B**), indicando muerte específica de células SKMEL28-R. Por el contrario, el tratamiento con inhibidores de BRAF PLX4720 o dabrafenib aumentó la razón GFP/mCherry (**Figura 37B**), indicando muerte específica de células SKMEL28. Las combinaciones de IgG1-AXL-107-vcMMAE y PLX4720, dabrafenib y trametinib, o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE mostraron razones más cercanas a 1 (**Figura 37B**), indicando que ambos tipos de células fueron destruidos con eficacia similar. El tratamiento con la combinación de IgG1-AXL-107-vcMMAE y dabrafenib dio como resultado una razón GFP/mCherry muy reducida (**Figura 37B**), indicando una destrucción más eficaz de las células SKMEL28-R a las concentraciones utilizadas.

Resultados de IHC

40 En total, se analizaron 45 muestras, de las cuales 3 no contenían ningún material tumoral y, por lo tanto, se excluyeron del análisis. Además, se incluyeron 7 muestras pre- y post- vemurafenib emparejadas de los mismos pacientes, y 1 muestra pre- y post- dabrafenib/trametinib emparejada.

45 En 41/42 muestras, se detectó la expresión de Axl en subconjuntos de la región de melanoma. La intensidad de la tinción difirió según el tumor del paciente (Tabla 21).

Además, se observó una regulación por incremento de la expresión de Axl (medida por el aumento de la intensidad de tinción por el patólogo) en 4/7 muestras pre- y post- vemurafenib emparejadas (Tabla 21).

Tabla 21. Tinción de Axl en tejido tumoral de pacientes con melanoma.

Núm. de Caso	Tratamiento	Pre-/post-tratamiento	Muestra emparejada	Células tumorales con tinción de Axl ^a	Comentarios
1	vemurafenib	post	NA	Parcialmente +	
2	vemurafenib	post	17	Débilmente + a +	
3	dabr/tram	post	NA	++ a +++	
4	vemurafenib	post	NA	Focalmente +	
5	vemurafenib	post	NA	Parcialmente débilmente +	
6	dabr/tram	post	40	NA	muy necrótica
7	dabr/tram	pre	16	Esporádica +	
8	vemurafenib	post	38	Esporádica +	Las células débilmente positivas en el borde del tumor podrían ser el resultado de un artefacto de tinción.
9	vemurafenib	post	NA	-	
10	vemurafenib	post	NA	Parcialmente débil +	
11	vemurafenib	post	NA	Débilmente +	muchos melanófagos +
12	vemurafenib	post	NA	Localmente débil +	algunos melanófagos +
13	vemurafenib	post	NA	++ a +++	
14	vemurafenib	post	39	Débilmente +	muchos melanófagos +
15	vemurafenib	post	24	Débilmente +	
16	dabr/tram	post	7	Débilmente +	
17	vemurafenib	pre	2	Parcialmente +	
18	vemurafenib	18 enfermedad estable post	NA	Débilmente +	
19	vemurafenib	post	NA	Localmente + a ++	
20	vemurafenib	20 enfermedad estable post	NA	Débilmente +	
21	vemurafenib	post	NA	Débilmente +	
22	vemurafenib	post	NA	Parcialmente +	muchos melanófagos +
23	vemurafenib	post	NA	+ a ++	
24	vemurafenib	pre	15	Esporádica +	
25	vemurafenib	post	NA	Esporádica +	
26	vemurafenib	pre	44	Débilmente +	muchos melanófagos +
27	vemurafenib	post	NA	Parcial y débilmente +	
28	vemurafenib	28	NA	Débilmente +	están presentes cantidades limitadas de

Núm. de Caso	Tratamiento	Pre-/post-tratamiento	Muestra emparejada	Células tumorales con tinción de Axi ^a	Comentarios
		enfermedad estable post			células tumorales
29	vemurafenib	post	NA	Parcial y débilmente +	
30	vemurafenib	post	NA	Parcialmente +	
31	vemurafenib	post	NA	Parcialmente +	
32	vemurafenib	post	NA	+	pequeña cantidad de células tumorales/melanófagos con melanina
33	vemurafenib	post	NA	Localmente débilmente +	
34	vemurafenib	post	NA	Débilmente + a +	
35	vemurafenib	post	NA	Débilmente +	
36	vemurafenib	post	NA	débilmente +	muchos melanófagos +
37	vemurafenib	post	NA	Parcialmente débil +	
38	vemurafenib	pre	8	Débilmente + a +	
39	vemurafenib	pre	14	+	Las células positivas están presentes en los senos de los ganglios linfáticos. No es seguro si son células tumorales o macrófagos ya que estas células contienen citoplasma bastante rico
40	dabr/tram	pre	6	NA	no se encuentran lesiones neoplásicas
41	vemurafenib	post	NA	NA	no se encuentran lesiones neoplásicas
42	vemurafenib	post	NA	Parcialmente +	las áreas negativas parciales podrían deberse a un artefacto de tinción
43	vemurafenib	post	NA	Débilmente + a +	
44	vemurafenib	post	26	+ a ++	
45	vemurafenib	post	NA	Parcialmente débilmente +	

^a -: negativa; intensidad de tinción positiva: débilmente + <+ <++ <+++; área de tinción positiva: esporádica < focal < local < parcial; NA: no disponible

Ejemplo 24 - Modelo PDX de CV1664

5 La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo PDX de cáncer de cuello uterino subcutáneo CV1664 en ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c (experimentos realizados por CrownBioscience, distrito de Changping, Beijing, China). La inoculación de fragmentos tumorales a ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c y la aleatorización se realizó como se describe en el Ejemplo 21.

10 El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) se realizó los días 0 y 7 después de la aleatorización de los grupos (**Figura 38**). El tratamiento los mismos días con paclitaxel (20 mg/kg; intraperitonealmente), IgG1-AXL-107 no conjugado (4 mg/kg), IgG1-b12-vcMMAE (4 mg/kg) e IgG1-b12 (4 mg/kg) fue utilizado como control.

15 IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una fuerte regresión tumoral en ambos niveles de dosis, que duró al menos hasta el día 49 (**Figura 38A, B**). El tratamiento con IgG1-AXL-107 no conjugado e IgG1-b12-vcMMAE solo indujo una inhibición mínima del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control IgG1-b12. El paclitaxel indujo una

regresión tumoral parcial.

Dos ratones que mostraron crecimiento tumoral tras la regresión tumoral inicial con 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE se volvieron a tratar con 2 dosis de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE los días 55 y 62. Esto dio como resultado una regresión parcial del tumor en ambos ratones (**Figura 38C**). Al volver a crecer los tumores, estos ratones se volvieron a tratar con 2 dosis de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE los días 105 y 112, lo que nuevamente dio como resultado en una regresión parcial del tumor en ambos animales. (**Figura 38C**).

Tres ratones que mostraron crecimiento tumoral tras la regresión tumoral inicial con paclitaxel se volvieron a tratar con 2 dosis de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE los días 55 y 62. Dos de los tres ratones mostraron regresión tumoral completa tras la repetición del tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 38D**). El otro ratón mostró regresión tumoral parcial. Al volver a crecer el tumor, este ratón se volvió a tratar nuevamente con 2 dosis de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE los días 98 y 105, lo que nuevamente dio como resultado una regresión parcial del tumor (**Figura 38D**).

LISTA DE REFERENCIAS

- Bahadoran et al., J Clin Oncol; 2013 Jul 1; 31(19): e324-e326
- Bansal et al., Oncotarget. 2015 Jun 20;6(17):15321-31
- Blakely et al., Cancer Discov. 2012 Oct;2(10):872-5
- Bleeker et al., J Immunol. 2004 Oct 1;173(7):4699-707.
- Bollag et al., Nat Rev Drug Discov 2012 Nov;11(11):873-86
- Brand et al., Clin Cancer Res. 2015 Jun 1;21(11):2601-12
- Dahlman et al., Cancer Discov. 2012 Sep;2(9):791-7. Epub 2012 Jul 13.
- Debruyne et al., Oncogene. 2015 Nov 30. doi: 10.1038/onc.2015.434
- Dufies et al., Oncotarget. 2011 Nov;2(11):874-85
- Elkabets et al., Cancer Cell. 2015 Apr 13;27(4):533-46
- Greig et al., Drugs, 2016 Feb;76(2):263-73.
- Herbst et al., Expert Opin Investig Drugs. 2007 Feb;16(2):239-49
- Hilger et al., Int J Clin Pharmacol Ther. 2002 Dec;40(12):567-8.
- Hong et al., Cancer Lett. 2008 Sep 18;268(2):314-24.
- Hong et al., Cancer Res. 2013 Jan 1;73(1):331-40.
- Hong et al., Clin Cancer Res. 2012 Apr 15;18(8):2326-35.
- Huang et al., Cancer Res. 2010 Sep 15;70(18):7221-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0391
- Kim et al., Curr Opin Mol Ther. 2004 Feb;6(1):96-103.
- Kim et al., Mol Oncol. 2013 Dec;7(6):1093-102.
- Konieczkowski et al., 2014, Cancer Discov 4: 816-827.
- Li et al., Oncogene. 2008 Aug 7;27(34):4702-11.
- Li et al., Cancer Lett. 2016 Jan 28;370(2):332-44.
- Liu et al., Cancer Res. 2009 Sep 1;69(17):6871-8
- Mahadevan et al., Oncotarget. 2015 Feb 10;6(4):1954-66
- Mordant et al., Mol Cancer Ther. 2010 Feb;9(2):358-68
- Müller et al., Nat Commun. 2014 Dec 15;5:5712
- Park et al., Leukemia. 2015 Dec;29(12):2382-9
- Pettazoni et al., Cancer Research 2015;75: 1091-1101.
- Pollack et al., J Pharmacol Exp Ther. 1999 Nov;291(2):739-48
- Prewett et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 Nov;19(6):419-27.
- Sirotnak et al., Clin Cancer Res. 2000 Dec;6(12):4885-92.
- Talavera et al., Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5851-9
- Tan et al., Lung Cancer. 2012 May;76(2):177-82.
- Wilson et al., Cancer Res. 2014 Oct 15;74(20):5878-90
- Wong et al., J Pharmacol Exp Ther. 2009 Apr;329(1):360-7.
- Xia et al., Oncogene. 2002 Sep 12;21(41):6255-63.
- Yang et al., Crit Rev Oncol Hematol. 2001 Apr;38(1):17-23.
- Zhang et al., Nat Genet. 2012 Jul 1;44(8):852-60
- Zhou et al., Oncogene. 2016 May;35(21):2687-97
- WO 2014/174111; Pierre Fabré Medicament and Spirogen Sarl
- WO 09/062690; U3 Pharma
- WO 2010/130751; U3 Pharma
- WO 2014/093707; Stanford University
- EP 2 228 392 A1; Chugai
- Yang et al., EORTC meeting 2013, Poster 493 (2013a)
- Yang et al., Int. J. Cancer: 132, E74-E84 (2013b)
- Paccez et al., Int. J. Cancer: 134, 1024-1033 (2014) (Epub 2013 Jun 4)

Leconet et al., *Oncogene*, 1-10 (2013)
 Linger et al., *Expert Opin. Ther. Targets*, 14(10):1073-1090 (2010)
 Li et al., *Oncogene*, 28, 3442-3455 (2009)
 Ye et al., *Oncogene*, 1-11 (2010)
 5 Alley et al., *Current Opinion in Chem. Bio.*, 4, 529-537 (2010)
 Iida et al., *Anticancer Research*, 34:1821-1828 (2014)
 Tschuch et al., AACR-EORTC meeting 2015, Poster A10 (2015)
 King et al., *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11100-5.
 Montagut et al., *J.Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4853-61.
 10 Sequist et al., *N Engl J Med.* 2015 Aug 6;373(6):578-9
 Li et al., *Structure.* 2008 Feb;16(2):216-27
 Pedersen et al., *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):588-97.
 Mishima et al., *Cancer Res.* 2001 Jul 15;61(14):5349-54
 WO 2012/175691; INSERM
 15 WO 2012/175692; INSERM
 WO 2013/064685; PF Medicament
 WO 2013/090776; INSERM
 WO 2009/063965; Chugai Pharmaceuticals
 WO 2010/131733
 20 Hfizi et al. et al., 2006, *FEBS Journal*, 273; 5231-5244
 WO 2007/059782; Genmab A/S
 Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)
 Holt et al.; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):484-90
 Revets et al.; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan;5(1):111-24
 25 Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988)
 Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)
 Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
 Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27 et al., 209-212, 1999
 Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)
 30 Korshunov et al, *Clin Sci (Lond).* 2012 Apr;122(8):361-8.
 Sambrook et al, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Ch. 15
 Kabat, E.A. et al., *Sequences of proteins of immunological interest.* 5ª Edición - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pág. 662, 680, 689 (1991)
 35 WO 2004/010957; Seattle Genetics, Inc.
 US 7,659,241; Seattle Genetics, Inc.
 Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™)*
 Molecule, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)
 WO 2011/131746; Genmab A/S
 40 WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech
 WO9850431; Genetech
 WO2011117329; Roche
 EP1870459; Amgen
 WO2009089004; Amgen
 45 US 2010/00155133; Chugai
 WO 2010/129304; Oncomed
 WO2007/110205; EMD Serono
 WO 2010/015792; Regeneron
 WO 11/143545; Pfizer/Rinat
 50 WO 2012/058768; Zymeworks/Merck
 WO 2011/028952; Xencor
 WO 2009/080254; Roche
 WO 2008/003116; F-Star
 US 7,262,028; Crucell/Merck
 55 US 7,612,181; Abbott
 WO 2010/0226923; Unilever, Sanofi Aventis
 US 7,951,918; Biogen Idec
 CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
 WO 2012/025525; Roche
 60 WO 2012/025530; Roche
 WO 2008/157379; Macrogenics
 WO 2010/080538; Macrogenics
 Goodman *et al.*, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990

Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993)
 US 5,194,594
 US 2005/0238649
 WO 2013/173391; Concertis Biosystems, Corp.

5 Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))
 US 4.681.581
 US 4.735.210
 US 5.101.827

10 US 5.102.990
 US 5.648.471
 US 5.697.902
 US 4.766.106
 US 4.179.337

15 US 4.495.285
 US 4.609.546
 Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)
 Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)
 Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)

20 Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)
 WO 2002/083180; Syngenta BV
 WO 2004/043493; Syngenta BV
 WO 2007/018431; Syngenta BV
 WO 2007/089149; Syngenta BV

25 WO 2009/017394; Syngenta BV
 WO 2010/62171; Syngenta BV
 US 6.989.452; Medarex
 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995

30 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
 Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)
 US 6.077.835
 WO 00/70087

35 Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)
 WO 00/46147
 Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
 Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)
 Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)

40 US 5.589.466
 US 5.973.972
 Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
 Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)

45 Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)
 Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994a)
 Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994b)
 Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995)
 Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)

50 Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992)
 Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993)
 Tuaillon et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)
 Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994)
 Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)

55 US 5.545.806
 US 5.569.825
 US 5.625.126
 US 5.633.425
 US 5.789.650

60 US 5.877.397
 US 5.661.016
 US 5.814.318
 US 5.874.299
 US 5.770.429

- US 5.545.807
WO 98/024884
WO 94/025585
WO 93/001227
5 WO 92/022645
WO 92/003918
WO 01/009187
Shieh, Neoplasia 2005
Koorstra, Cancer Biol Ther 2009
10 Hector, Cancer Biol Ther 2010
Sun, Ann Oncol 2003
Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase
15 "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990)
Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993)
US 5.057.313
US 6.331.175
20 US 5.635.483
US 5.780.588
Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584
US5663149
Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965
25 Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volumen, 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004
US 2005/0238649
US 7.498.298; Seattle Genetics, Inc.
US 7.994.135; Seattle Genetics, Inc.
30 WO 2005/081711; Seattle Genetics, Inc.
Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208
EP 2 220 131; U3 Pharma
WO 2011/159980; Genentech
Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23
35 US 7.829.531; Seattle Genetics, Inc.
US 7.851.437; Seattle Genetics, Inc.
WO 2013/173392; Concortis Biosystems, Corp.
WO 2013/173393; Concortis Biosystems, Corp.
Sun et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290
40 McDonagh et al., (2006) Protein Eng. Design Sel. 19: 299-307
Alley et al., (2008) Bioconjugate Chem. 19: 759-765

LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> Genmab A/S

<120> PRODUCTOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO ESPECÍFICOS DE AXL PARA TRATAMIENTO DE CÁNCER
50 <130> P/0097-WO

<160> 162

<170> PatentIn versión 3.5
55 <210> 1
<211> 116
<212> PRT
<213> homo sapiens
60 <400> 1

ES 2 784 685 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ile Trp Ile Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

ES 2 784 685 T3

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ser Ile Ser Gly Ala Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85          90          95

Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

5

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

```

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35          40          45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105

```

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

15

ES 2 784 685 T3

<400> 5

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ser Ala Ile Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

5

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 6

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

15

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

ES 2 784 685 T3

<213> homo sapiens

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Gly Phe Ile Met Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

ES 2 784 685 T3

Glu Val Gln Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Gly Phe Ile Leu Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

ES 2 784 685 T3

<400> 10

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ser Asp Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
          100          105          110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe
          85           90           95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

ES 2 784 685 T3

<213> homo sapiens

<400> 12

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1		5		10		15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	20		25		30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35		40		45		
Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50		55		60		
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65		70		75		80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85		90		95		
Ala	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Ala	Phe	100		105		110		
Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115		120		125					

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1		5		10		15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	20		25		30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	35		40		45		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50		55		60		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	65		70		75		80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser	Phe	85		90		95		
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	100		105									

ES 2 784 685 T3

<210> 14
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu His Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 15

ES 2 784 685 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Gly Asn Trp Asp His Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> homo sapiens

ES 2 784 685 T3

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Gln Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Gly Asn Trp Asp His Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Thr Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

ES 2 784 685 T3

<213> homo sapiens

<400> 19

5

```

Gln Val Pro Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20          25          30
His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Glu Ile Ser His Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Ser Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Thr Ile Ile Thr His Phe Asp Tyr
100         105         110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 20

15

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35          40          45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr
85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100         105

```

<210> 21

<211> 124

ES 2 784 685 T3

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

5

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Val Gln Lys Phe
50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
          100          105          110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 22

10

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

```

15

ES 2 784 685 T3

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 124
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

ES 2 784 685 T3

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 26

ES 2 784 685 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

ES 2 784 685 T3

<400> 28

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65				70						75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Leu	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100					105							

5

<210> 29

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 29

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70						75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Phe	Asp
			100					105					110		
Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								

15

<210> 30

ES 2 784 685 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5 <400> 30

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
  
```

<210> 31
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

<400> 31

15

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
  
```

ES 2 784 685 T3

1					5					10					15				
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr				
		20						25				30							
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
		35				40						45							
Gly	Glu	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys				
50						55				60									
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu				
65					70				75						80				
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
				85				90						95					
Arg	Phe	Ile	Thr	Met	Ile	Arg	Gly	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asp	Tyr				
		100						105				110							
Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115				120													

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 32

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Phe	Ile	Thr	Leu	Ile	Arg	Gly	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asp	Tyr
				100					105					110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

ES 2 784 685 T3

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 33

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35          40          45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
  
```

10

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

15

<400> 34

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Thr Tyr
          20          25          30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val
          50          55          60
  
```

ES 2 784 685 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Lys Leu Gly Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 37

Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr
1 5 122

ES 2 784 685 T3

5	<210> 38 <211> 9 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 38	Ala Lys Ile Trp Ile Ala Phe Asp Ile 1 5
10	<210> 39 <211> 7 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 39	
15		Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr 1 5
20	<210> 40 <211> 9 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 40	
25		Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr 1 5
30	<210> 41 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 41	
35		Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala 1 5
40	<210> 42 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 42	
45		Ile Ser Ile Ser Gly Ala Ser Thr 1 5
50	<210> 43 <211> 13 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 43	
55		Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Ile 1 5 10
	<210> 44 <211> 6 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 44	

ES 2 784 685 T3

		Gln Gly Ile Ser Asn Trp
		1 5
5	<210> 45	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 45	
10		Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
		1 5
	<210> 46	
	<211> 8	
15	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 46	
20		Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
		1 5
	<210> 47	
	<211> 8	
25	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 47	
30		Ile Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr
		1 5
	<210> 48	
	<211> 13	
35	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 48	
40		Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Phe
		1 5 10
	<210> 49	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
45	<400> 49	
		Gln Gly Ile Ser Asn Trp
		1 5
	<210> 50	
50	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 50	
55		Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
		1 5
	<210> 51	

ES 2 784 685 T3

<211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 5 <400> 51
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 52
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 52
 15 Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Ala
 1 5
 <210> 53
 20 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 53
 25 Ala Lys Pro Gly Phe Ile Met Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 54
 30 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 54
 35 Ala Lys Pro Gly Phe Ile Leu Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 55
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 55
 45 Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr
 1 5
 <210> 56
 50 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 56
 55 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 57
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 57

ES 2 784 685 T3

		Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
		1 5
5	<210> 58	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 58	
10		Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
		1 5
	<210> 59	
	<211> 18	
15	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 59	
20		Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
		1 5 10 15
	Asp Ile	
	<210> 60	
25	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 60	
30		Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
		1 5
	<210> 61	
	<211> 8	
35	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 61	
40		Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
		1 5
	<210> 62	
	<211> 8	
45	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
	<400> 62	
50		Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
		1 5
	<210> 63	
	<211> 8	
	<212> PRT	
55	<213> homo sapiens	
	<400> 63	
		Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
		1 5

ES 2 784 685 T3

5 <210> 64
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 64
 Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
 1 5 10 15
 10 Asp Ile
 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 15 <400> 65
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 20 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 25 <400> 66
 Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
 1 5
 30 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 35 <400> 67
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 40 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 68
 45 Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5
 50 <210> 69
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 69

ES 2 784 685 T3

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 70

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 71

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 72

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 73

Ile Asn Gln Ser Gly
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 74

Ile Gln Gln Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 75

Ala Ser Gly Asn Trp Asp His Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

ES 2 784 685 T3

5 <210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 76
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5
 10 <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 15 <400> 77
 Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Trp Thr
 1 5
 20 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 25 <400> 78
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr His
 1 5
 30 <210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 35 <400> 79
 Ile Ser His Ser Gly Arg Thr
 1 5
 40 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 80
 Ala Ser Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Thr Ile Ile Thr His Phe Asp
 1 5 10 15
 45 Tyr
 <210> 81
 <211> 6
 <212> **PRT**
 50 <213> homo sapiens
 <400> 81
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5
 55 <210> 82

ES 2 784 685 T3

5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 82
 Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 10 <210> 83
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 15 <400> 83
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 20 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 84
 25 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala
 1 5
 30 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 85
 Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
 1 5 10 15
 35 Ile
 <210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> homo sapiens
 <400> 86
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 45 <210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 50 <400> 87
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
 1 5
 55 <210> 88
 <211> 8

ES 2 784 685 T3

[illegible]

ES 2 784 685 T3

<400> 94
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val
 1 5
 5
 <210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 10
 <400> 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
 1 5 10 15
 Ile
 15
 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 20
 <400> 96
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 25
 <210> 97
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30
 <400> 97
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
 1 5
 35
 <210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 98
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 40
 <210> 99
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 45
 <400> 99
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val
 1 5
 50
 <210> 100
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 55
 <400> 100

ES 2 784 685 T3

	Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
	1 5 10 15
	Ile
5	<210> 101 <211> 6 <212> PRT <213> homo sapiens
10	<400> 101 Gln Ser Val Ser Ser Tyr 1 5
15	<210> 102 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens
20	<400> 102 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Thr 1 5
25	<210> 103 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens
30	<400> 103 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala 1 5
35	<210> 104 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens
40	<400> 104 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala 1 5
45	<210> 105 <211> 18 <212> PRT <213> homo sapiens
50	<400> 105 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp 1 5 10 15 Ile Ser <210> 106 <211> 7 <212> PRT <213> homo sapiens

ES 2 784 685 T3

<400> 106
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5
 5
 <210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 10
 <400> 107
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
 1 5
 15
 <210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 20
 <400> 108
 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5
 25
 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30
 <400> 109
 Ile Ser His Ser Gly Arg Thr
 1 5
 35
 <210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 110
 Ala Arg Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Ala Ile Ile Thr His Phe Asp
 1 5 10 15
 40
 Tyr
 <210> 111
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 45
 <400> 111
 Ala Arg Phe Ile Thr Leu Ile Arg Gly Ala Ile Ile Thr His Phe Asp
 1 5 10 15
 50
 Tyr
 <210> 112
 <211> 6
 <212> PRT

ES 2 784 685 T3

<213> homo sapiens
 <400> 112
 5 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5
 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> homo sapiens
 <400> 113
 15 Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 114
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> homo sapiens
 <400> 114
 25 Gly Phe Ser Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5
 <210> 115
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30 <400> 115
 35 Ile Ser Tyr Asp Gly Asp Asn Lys
 1 5
 <210> 116
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 40 <400> 116
 Ala Arg Gly Arg Lys Leu Gly Ile Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 117
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> homo sapiens
 <400> 117
 50 Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 1 5
 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> homo sapiens
 <400> 118

ES 2 784 685 T3

		Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
		1 5
5	<210> 119	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
10	<220>	
	<221> RASGO_MISC	
	<222> (6)..(6)	
	<223> En donde X es A o G	
15	<400> 119	
		Ile Ser Ile Ser Gly Xaa Ser Thr
		1 5
20	<210> 120	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
25	<220>	
	<221> Varios	
	<222> (13)..(13)	
	<223> En donde X es I de F	
30	<400> 120	
		Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Xaa
		1 5 10
35	<210> 121	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
40	<220>	
	<221> RASGO_MISC	
	<222> (8)..(8)	
	<223> En donde X es I o F	
45	<400> 121	
		Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Xaa
		1 5
50	<210> 122	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> homo sapiens	
55	<220>	
	<221> RASGO_MISC	
	<222> (2)..(2)	
	<223> En donde X es S o R	
60	<220>	

<221> RASGO_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> En donde X es T o A

5 <400> 122

Ala	Xaa	Phe	Ile	Thr	Met	Ile	Arg	Gly	Xaa	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asp
1				5					10					15	

Tyr

10 <210> 123
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

15 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> En donde X es S o N

20 <400> 123

				Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Xaa	Tyr	Ala
				1				5			

25 <210> 124
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

30 <400> 124

				Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr
				1				5			

35 <210> 125
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 125

Ala	Lys	Glu	Gly	Tyr	Ile	Trp	Phe	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Ala	Phe
1				5					10					15	

40 Asp Ile

45 <210> 126
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

50 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> En donde X es A o V

<400> 126

ES 2 784 685 T3

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Xaa
1 5

5
<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

10
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (5)..(5)
<223> En donde X es D o N

15
<400> 127
Ala Arg Arg Gly Xaa Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile

20
<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

25
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (4)..(4)
<223> En donde X es S o se suprime

30
<400> 128
Gln Ser Val Xaa Ser Ser Tyr
1 5

35
<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

40
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (3)..(3)
<223> En donde X es R o Y

45
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (4)..(4)
<223> En donde X es S o G

50
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (4)..(4)
<223> En donde X es S o G

55
<220>
<221> RASGO_MISC
<222> (5)..(5)
<223> En donde X es N o S

<220>
<221> RASGO_MISC

<222> (6)..(6)
 <223> En donde X es W o S

5
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (6)..(6)
 <223> En donde X es W o S

10
 <220>
 <221> RASGO_MISC
 <222> (7)..(7)
 <223> En donde X es L o Y

15
 <400> 129
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5

20
 <210> 130
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 130
 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
 20 25 30
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45
 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60
 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 25 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp

ES 2 784 685 T3

85							90							95						
Ile	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr					
			100					105					110							
Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser					
		115					120					125								
Gln	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu					
	130					135					140									
Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys					
145					150					155					160					
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp					
				165					170					175						
Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu					
			180					185					190							
His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His					
		195					200					205								
Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu					
	210					215					220									
Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu					
225					230					235					240					
Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr					
				245					250					255						
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln					
			260					265					270							
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser					
		275					280					285								
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro					
	290					295					300									
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp					
305					310					315					320					
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro					
				325					330					335						

ES 2 784 685 T3

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495
 Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

ES 2 784 685 T3

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750
 Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765
 Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 770 775 780
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830
 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
 835 840 845

ES 2 784 685 T3

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 131

<211> 904

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 131

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
20 25 30

Tyr Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
35 40 45

Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
50 55 60

Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
65 70 75 80

Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
85 90 95

Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
100 105 110

Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met
115 120 125

Val His Leu Glu Gly Arg Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Phe Val Gly
130 135 140

Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Lys Ala Val
145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro
165 170 175

ES 2 784 685 T3

Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Pro	180	185	190	
Val	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	Asn	195	200	205	
Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	210	215	220	
Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	His	His	225	230	235	240
Leu	His	Val	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	245	250	255	
Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	Cys	Asn	Leu	Gln	Ala	260	265	270	
Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Val	Gly	Ile	Trp	Leu	Gly	Lys	Ser	Asp	Pro	275	280	285	
Pro	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	290	295	300	
Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ile	Ser	305	310	315	320
Cys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	325	330	335	
Glu	Thr	Thr	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ala	340	345	350	
Met	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val	355	360	365	
Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln	370	375	380	
Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Thr	385	390	395	400
Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Val	Ala	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val	405	410	415	
Thr	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro				

ES 2 784 685 T3

420	425	430
Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln Pro Leu His His Leu Val		
435	440	445
Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu		
450	455	460
Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe		
465	470	475
Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu		
	485	490
Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys		
	500	505
Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile		
	515	520
Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His		
	530	535
Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val		
545	550	555
Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val		
	565	570
Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe		
	580	585
Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met		
	595	600
Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro		
	610	615
Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser		
625	630	635
Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr		
	645	650
Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr		
	660	665
		670

ES 2 784 685 T3

Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 675 680 685
 Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser
 690 695 700
 Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys
 705 710 715 720
 Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr
 725 730 735
 Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile
 740 745 750
 Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile
 755 760 765
 Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys
 770 775 780
 Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro
 785 790 795 800
 Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr
 805 810 815
 Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val
 820 825 830
 Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly
 835 840 845
 Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys
 850 855 860
 Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro
 865 870 875 880
 Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala
 885 890 895
 Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 900

<210> 132
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 132

ES 2 784 685 T3

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

ES 2 784 685 T3

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495

ES 2 784 685 T3

Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr
			500					505					510		
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp
		515					520					525			
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu
	530					535					540				
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser
545					550					555					560
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg
			565						570					575	
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe
			580					585					590		
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser
		595					600					605			
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys
	610					615					620				
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln
625					630					635					640
Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile
				645					650					655	
Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp
			660					665					670		
Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val
		675					680					685			
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg
	690					695					700				
Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser
705					710					715					720
Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly
				725					730					735	
Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly

ES 2 784 685 T3

740

745

750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 133

<211> 894

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 133

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp

ES 2 784 685 T3

65				70				75				80			
Ser	Thr	Gln	Thr	Gln 85	Val	Pro	Leu	Gly	Glu 90	Asp	Glu	Gln	Asp	Asp 95	Trp
Ile	Val	Val	Ser 100	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr 105	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser 110	Asp	Thr
Gly	Gln	Tyr 115	Gln	Cys	Leu	Val	Phe 120	Leu	Gly	His	Gln	Thr 125	Phe	Val	Ser
Gln	Pro 130	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu 135	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr 140	Phe	Leu	Glu	Glu
Pro 145	Glu	Asp	Lys	Ala	Val 150	Pro	Ala	Asn	Thr	Pro 155	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys 160
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro 165	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 170	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln 175	Asp
Ala	Val	Pro	Leu 180	Ala	Pro	Val	Thr	Gly 185	His	Ser	Ser	Gln	His 190	Ser	Leu
Gln	Thr	Pro 195	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr 200	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys 205	Glu	Ala	His
Asn 210	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr 215	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr 220	Ile	Thr	Val	Leu
Pro 225	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn 230	Leu	His	Leu	Val	Ser 235	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu 240
Leu	Glu	Val	Ala	Trp 245	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser 250	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu 255	Thr
His	Cys	Thr	Leu 260	Gln	Ala	Val	Leu	Ser 265	Asp	Asp	Gly	Met	Gly 270	Ile	Gln
Ala	Gly	Glu 275	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu 280	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser 285	Gln	Ala	Ser
Val	Pro 290	Pro	His	Gln	Leu	Arg 295	Leu	Gly	Ser	Leu	His 300	Pro	His	Thr	Pro
Tyr 305	His	Ile	Arg	Val	Ala 310	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln 315	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp 320

ES 2 784 685 T3

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495
 Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

ES 2 784 685 T3

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830

ES 2 784 685 T3

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 134

<211> 894

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 134

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

ES 2 784 685 T3

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Gln Arg Pro His His Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255

His Cys Asn Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Val Gly Ile Trp
 260 265 270

Leu Gly Lys Ser Asp Pro Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser
 275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro
 290 295 300

Tyr His Ile Arg Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp
 305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

ES 2 784 685 T3

										405											410											415	
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln																		
										420											425											430	
Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp																		
										435											440											445	
Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val																		
										450											455											460	
Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg																		
										465											470											475	480
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val																		
										485											490											495	
Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr																		
										500											505											510	
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp																		
										515											520											525	
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu																		
										530											535											540	
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser																		
										545											550											555	560
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg																		
										565											570											575	
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe																		
										580											585											590	
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser																		
										595											600											605	
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys																		
										610											615											620	
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln																		
										625											630											635	640
Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile																		
										645											650											655	

ES 2 784 685 T3

Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp	660	665	670	
Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val	675	680	685	
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	690	695	700	
Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	705	710	715	720
Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	725	730	735	
Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	740	745	750	
Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	755	760	765	
Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	770	775	780	
Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro	Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg	785	790	795	800
Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	805	810	815	
Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	820	825	830	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	835	840	845	
Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	His	Pro	Ala	Gly	850	855	860	
Arg	Tyr	Val	Leu	Cys	Pro	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	865	870	875	880
Asp	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala			885	890		

<210> 135
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 135

ES 2 784 685 T3

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

ES 2 784 685 T3

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Val Ser Ala Met Arg Asn Gly Ser Gln Val Leu Val Arg
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Val Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Arg Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Thr Arg Glu Val Thr Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Ser Val Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln
 420 425 430
 Pro Leu His His Leu Val Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495

ES 2 784 685 T3

Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr
			500					505					510		
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp
		515					520					525			
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu
	530					535					540				
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser
545					550					555					560
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg
			565						570					575	
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe
			580					585					590		
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser
		595					600					605			
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys
	610					615					620				
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln
625					630					635					640
Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile
				645					650					655	
Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp
			660					665					670		
Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val
		675					680					685			
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg
	690					695					700				
Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser
705					710					715					720
Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly
				725					730					735	
Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly

ES 2 784 685 T3

740

745

750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 136

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 136

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly His Thr Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 784 685 T3

	65		70		75		80									
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Lys	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asp
				100					105					110		
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
			115					120								
5	<210> 137 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 137															
10						Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala			
						1				5						
15	<210> 138 <211> 8 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 138															
20						Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	His	Thr			
						1				5						
25	<210> 139 <211> 17 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 139															
	Ala	Lys	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asp
	1				5					10					15	
30	Tyr <210> 140 <211> 107 <212> PRT <213> homo sapiens <400> 140															
35	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	

ES 2 784 685 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Glu Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 141

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 142

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 143
<211> 123
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 143

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ES 2 784 685 T3

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Val Gln Asn Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp His Ile Ser Met Leu Arg Gly Ile Ile Ile Arg Asn Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 144

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 144

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Arg
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 145

<211> 124

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 145

ES 2 784 685 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Glu Tyr Phe Gln
100 105 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 146
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 146

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Phe Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 147
<211> 893
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

ES 2 784 685 T3

<400> 147

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

ES 2 784 685 T3

Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	210	215	220
Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	225	230	235
Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	245	250	255
Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln	Ala	260	265	270
Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Ala	Ser	Val	275	280	285
Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	290	295	300
His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp	Thr	305	310	315
His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	325	330	335
Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His	Trp	340	345	350
Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	355	360	365
Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	370	375	380
Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Asn	385	390	395
Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp	405	410	415
Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro	420	425	430
Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp	Pro	435	440	445
Trp	Trp	Tyr	Ile	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val	Leu	450	455	460

ES 2 784 685 T3

Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr
 465 470 475 480
 Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg
 485 490 495
 Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu
 500 505 510
 Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val
 515 520 525
 Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly
 530 535 540
 Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile
 545 550 555 560
 Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser
 565 570 575
 Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp
 580 585 590
 His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu
 595 600 605
 Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His
 610 615 620
 Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro
 625 630 635 640
 Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala
 645 650 655
 Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu
 660 665 670
 Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala
 675 680 685
 Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln
 690 695 700
 Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu

ES 2 784 685 T3

705		710		715		720
Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val						
		725		730		735
Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val						
		740		745		750
Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys						
		755		760		765
Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys						
		770		775		780
Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu						
		785		790		800
Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp						
		805		810		815
Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro						
		820		825		830
Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Leu Asp Pro Lys						
		835		840		845
Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ser Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg						
		850		855		860
Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp						
		865		870		880
Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala						
		885		890		

<210> 148
 <211> 903
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 148

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys						
1		5		10		15
Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp						
		20		25		30
Tyr Ala Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly						

ES 2 784 685 T3

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

ES 2 784 685 T3

Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg
 290 295 300
 Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys
 305 310 315 320
 Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu
 325 330 335
 Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr
 340 345 350
 Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro
 355 360 365
 Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp
 370 375 380
 Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu
 385 390 395 400
 Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala
 405 410 415
 Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu
 420 425 430
 Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys
 435 440 445
 Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu
 450 455 460
 Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu
 465 470 475 480
 Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro
 485 490 495
 Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser
 500 505 510
 Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser
 515 520 525
 Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys
 530 535 540

ES 2 784 685 T3

Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	545	550	555	560
Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser	Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	565	570	575	
Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	580	585	590	
Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	595	600	605	
Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	610	615	620	
Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	625	630	635	640
Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gln	645	650	655	
Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	660	665	670	
Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	675	680	685	
Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Lys	690	695	700	
Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	Met	705	710	715	720
Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	725	730	735	
Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	Ala	740	745	750	
Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	Tyr	755	760	765	
Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys	Leu	770	775	780	
Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro	Gln	785	790	795	800

ES 2 784 685 T3

Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu
805 810 815

Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn
820 825 830

Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly
835 840 845

Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu
850 855 860

Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser
865 870 875 880

Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala
885 890 895

Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
900

<210> 149
<211> 904
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 149

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
20 25 30

Tyr Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
35 40 45

Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
50 55 60

Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
65 70 75 80

Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
85 90 95

Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
100 105 110

ES 2 784 685 T3

Arg	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gln	Cys	Met	115	120	125
Val	His	Leu	Glu	Gly	Arg	Thr	Phe	Val	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	130	135	140
Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Lys	Ala	Val	145	150	155
Pro	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	165	170	175
Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Pro	180	185	190
Val	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	Asn	195	200	205
Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	210	215	220
Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	His	His	225	230	235
Leu	His	Val	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	245	250	255
Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	Cys	Asn	Leu	Gln	Ala	260	265	270
Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Val	Gly	Ile	Trp	Leu	Gly	Lys	Ser	Asp	Pro	275	280	285
Pro	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	290	295	300
Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ile	Ser	305	310	315
Cys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	325	330	335
Glu	Thr	Thr	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ala	340	345	350
Met	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val			

ES 2 784 685 T3

355	360	365
Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Gly Gln 370 375 380		
Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Thr Arg Glu Val Thr 385 390 395 400		
Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala Asn Leu Thr Val Ser Val 405 410 415		
Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro 420 425 430		
Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln Pro Leu His His Leu Val 435 440 445		
Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu 450 455 460		
Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe 465 470 475 480		
Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu 485 490 495		
Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys 500 505 510		
Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile 515 520 525		
Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His 530 535 540		
Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val 545 550 555 560		
Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val 565 570 575		
Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe 580 585 590		
Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met 595 600 605		

ES 2 784 685 T3

Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	610	615	620
Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	625	630	635
Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	645	650	655
Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr	660	665	670
Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	675	680	685
Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	690	695	700
Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys	705	710	715
Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr	725	730	735
Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile	740	745	750
Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	755	760	765
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys	770	775	780
Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro	785	790	795
Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr	805	810	815
Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val	820	825	830
Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	835	840	845
Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys	850	855	860

ES 2 784 685 T3

Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro
865 870 875 880

Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala
885 890 895

Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
900

<210> 150

<211> 888

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 150

Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Trp Leu Ala Leu Cys Cys Trp Gly
1 5 10 15

Cys Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
20 25 30

Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
35 40 45

Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
50 55 60

Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
65 70 75 80

Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
85 90 95

Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met
100 105 110

Val His Leu Glu Gly Arg Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Phe Val Gly
115 120 125

Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val
130 135 140

Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr
165 170 175

ES 2 784 685 T3

Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu	His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	180	185	190	
Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	195	200	205	
Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	210	215	220	
Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	225	230	235	240
Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	245	250	255	
Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	260	265	270	
Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	275	280	285	
Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	290	295	300	
Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	305	310	315	320
Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	325	330	335	
Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	340	345	350	
Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	355	360	365	
Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	370	375	380	
Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	385	390	395	400
Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	405	410	415	
Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	420	425	430	

ES 2 784 685 T3

Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu
 435 440 445
 Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe
 450 455 460
 Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu
 465 470 475 480
 Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys
 485 490 495
 Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile
 500 505 510
 Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His
 515 520 525
 Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val
 530 535 540
 Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val
 545 550 555 560
 Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe
 565 570 575
 Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met
 580 585 590
 Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro
 595 600 605
 Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser
 610 615 620
 Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr
 625 630 635 640
 Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr
 645 650 655
 Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 660 665 670
 Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser

ES 2 784 685 T3

	675						680						685					
Lys 690	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp 695	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Gly 700	Arg	Ile	Ala	Lys			
Met 705	Pro	Val	Lys	Trp	Ile 710	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu 715	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr 720			
Thr	Ser	Lys	Ser	Asp 725	Val	Trp	Ser	Phe	Gly 730	Val	Thr	Met	Trp	Glu 735	Ile			
Ala	Thr	Arg	Gly 740	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly 745	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile			
Tyr	Asp	Tyr 755	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn 760	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys			
Leu 770	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu 775	Met	Ser	Arg	Cys	Trp 780	Glu	Leu	Asn	Pro			
Gln 785	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe 790	Thr	Glu	Leu	Arg	Glu 795	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr 800			
Leu	Lys	Ala	Leu	Pro 805	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro 810	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr 815	Val			
Asn	Met	Asp	Glu 820	Gly	Gly	Gly	Tyr 825	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly			
Gly	Ala	Asp 835	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro 840	Asp	Pro	Lys	Asp	Ser 845	Cys	Ser	Cys			
Leu 850	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	His 855	Pro	Ala	Gly	Arg	Tyr 860	Val	Leu	Cys	Pro			
Ser 865	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro 870	Ala	Gln	Pro	Ala	Asp 875	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala 880			
Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp 885	Gly	Ala											

<210> 151
<211> 894
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción de proteína quimérica

<400> 151

ES 2 784 685 T3

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

ES 2 784 685 T3

245										250					255				
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln				
			260					265					270						
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser				
		275					280					285							
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro				
	290					295					300								
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp				
305					310					315					320				
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro				
			325						330					335					
Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His				
			340					345					350						
Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg				
		355					360					365							
Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly				
	370					375					380								
Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser				
385					390					395					400				
Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro				
			405						410					415					
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln				
			420					425					430						
Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp				
		435					440					445							
Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val				
	450					455					460								
Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg				
465					470					475					480				
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val				
			485						490					495					

ES 2 784 685 T3

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

ES 2 784 685 T3

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 152

<211> 894

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción de proteína quimérica

<400> 152

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

ES 2 784 685 T3

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 85 90 95
 Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
 100 105 110
 Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 115 120 125
 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 130 135 140
 Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175
 Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190
 His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205
 Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220
 Pro Gln Arg Pro His His Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Asn Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Val Gly Ile Trp
 260 265 270
 Leu Gly Lys Ser Asp Pro Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp
 305 310 315 320

ES 2 784 685 T3

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495
 Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

ES 2 784 685 T3

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu

ES 2 784 685 T3

820

825

830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 153

<211> 894

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción de proteína quimérica

<400> 153

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

ES 2 784 685 T3

Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys	145	150	155	160
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp	165	170	175	
Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu	180	185	190	
His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	195	200	205	
Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	210	215	220	
Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	225	230	235	240
Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	245	250	255	
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln	260	265	270	
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	275	280	285	
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro	290	295	300	
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp	305	310	315	320
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	325	330	335	
Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ala	Met	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	340	345	350	
Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	355	360	365	
Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	370	375	380	
Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Val	Ala				

ES 2 784 685 T3

385						390						395						400
Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro			
				405					410					415				
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Pro	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln			
				420					425					430				
Pro	Leu	His	His	Leu	Val	Ser	Glu	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Phe	Ser	Trp			
				435					440					445				
Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val			
				450					455					460				
Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg			
465					470					475					480			
Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val			
				485					490					495				
Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr			
				500					505					510				
Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp			
				515					520					525				
Val	Met	Val	Asp	Arg	His	Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu			
				530					535					540				
Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val	Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser			
545					550					555					560			
Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg			
				565					570					575				
Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe			
				580					585					590				
Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser			
				595					600					605				
Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys			
				610					615					620				
His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln			
625					630					635					640			

ES 2 784 685 T3

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 154
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

	<400> 154	
	aagcagtggat atcaacgcag agtacgcggg	30
5	<210> 155 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 155	
15	acggacggca ggaccact	18
	<210> 156 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 156	
	acggacggca ggaccactaa gcagtggat caacgcaga	39
30	<210> 157 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 157	
40	cagcaggcac accactgagg cagtccaga tttc	34
	<210> 158 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 158	
50	acggacggca ggaccagt	18
	<210> 159 <211> 41 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
60	<400> 159	
	acggacggca ggaccagtaa gcagtggat caacgcagag t	41

5	<210> 160		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 160		
	ggaggagggc gccagtggga agaccga	27	
15	<210> 161		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 161		
	gccagatata cgcgttgaca	20	
25	<210> 162		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 162		
	gatctgctat ggcagggcct	20	
35			

REIVINDICACIONES

1. Un producto conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana para su uso en el tratamiento del cáncer resistente a al menos un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de serina/treonina quinasa y un agente quimioterapéutico, en donde el ADC comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente.
2. El ADC para el uso de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de tirosina quinasa se selecciona del grupo que consiste en erlotinib, afatinib, gefitinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib, imatinib, sunitinib, crizotinib, midostaurina (PKC412) y quizartinib (AC220).
3. El ADC para el uso de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de serina/treonina quinasa es un inhibidor de BRAF o un inhibidor de MEK.
4. El ADC para el uso de la reivindicación 3, en donde
 - (a) el inhibidor de BRAF se selecciona del grupo que consiste en vemurafenib (PLX4032), dabrafenib y un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos, tal como PLX4720;
 - (b) el inhibidor de MEK se selecciona entre trametinib y selumetinib (AZD6244), y un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos.
5. El ADC para el uso de la reivindicación 1, en donde agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, metformina, doxorubicina, etopósido, carboplatino o una combinación de los mismos.
6. El ADC para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
 - (a) el inhibidor de tirosina quinasa se selecciona entre un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antagonista de HER2, inhibidor de ALK y un inhibidor de FLT3, o una combinación de cualquiera de los mismos;
 - (b) el inhibidor de serina/treonina quinasa se selecciona entre un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, o una combinación de los mismos;
 - (c) el agente quimioterapéutico se selecciona entre paclitaxel, docetaxel, cisplatino, metformina, doxorubicina, etopósido, carboplatino o una combinación de los mismos.
7. El ADC para el uso de la reivindicación 6, en donde
 - (a) el inhibidor de tirosina quinasa es un inhibidor de EGFR;
 - (b) el inhibidor de serina/treonina quinasa es un inhibidor de BRAF; y
 - (c) el agente quimioterapéutico es un taxano.
8. El ADC para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es un cáncer que expresa AXL.
9. El ADC para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cáncer se selecciona entre un melanoma, un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un cáncer cervical, un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), un cáncer de mama, un tumor del estroma gastrointestinal (GIST), un cáncer renal, un cáncer de próstata, un neuroblastoma, un cáncer de páncreas, un cáncer de esófago, un rabdomiosarcoma, una leucemia mieloide aguda (AML) o una leucemia mieloide crónica (CML).
10. El ADC para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se utiliza combinado con el agente terapéutico, en donde el ADC y el agente terapéutico se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
11. El ADC para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso en el tratamiento de un NSCLC resistente a un agente inhibidor de EGFR, tal como erlotinib.
12. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se utiliza en el tratamiento de un melanoma resistente a vemurafenib.
13. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se utiliza en el tratamiento de un cáncer cervical resistente al paclitaxel o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del mismo, tal como

docetaxel.

14. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde ADC comprende un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico o un radioisótopo conectado al anticuerpo.

15. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el radical terapéutico es un agente citotóxico, opcionalmente conectado al ADC con un conector.

16. El ADC para el uso de la reivindicación 15, en donde el agente citotóxico está conectado al 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.

17. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en donde agente citotóxico está conectado al anticuerpo con un conector no escindible, tal como 4(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (MCC) o maleimidocaproilo (MC).

18. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en agentes dirigidos al ADN, p. ej. agentes alquilantes y de entrecruzamiento 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)-matansina (DM1) y tubulisina; y análogos de nucleósidos; o análogos, derivados o profármacos de los mismos.

19. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde

- (a) el conector es escindible y el agente citotóxico tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
- (b) el conector es escindible y el agente citotóxico no tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
- (c) el conector no es escindible y el agente citotóxico tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad;
- o
- (d) el conector no es escindible y el agente citotóxico no tiene capacidad de destrucción por efecto de vecindad.

20. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde conector es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE.

21. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde conector es SSP y el agente citotóxico es DM1.

22. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde el fármaco es duostatina3.

23. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de aminoácidos de AXL humana es la especificada en SEQ ID NO: 130.

24. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a AXL de mono cinomolgo como se especifica en SEQ ID NO: 147.

25. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que es al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 1 y una región VL que es al menos el 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 97%, tal como al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 2 **[107]**.

26. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una región de unión comprende una región VH que comprende SEC ID NO: 1 y una región VL que comprende SEC ID NO: 2 **[107]**.

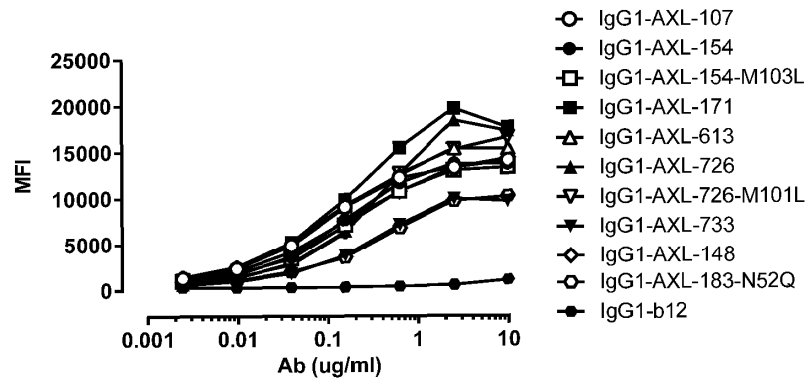
27. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de SEC ID NO: 39, GAS, y 40, respectivamente, **[107]**, el conector es mc-vc-PAB, y el agente citotóxico es MMAE.

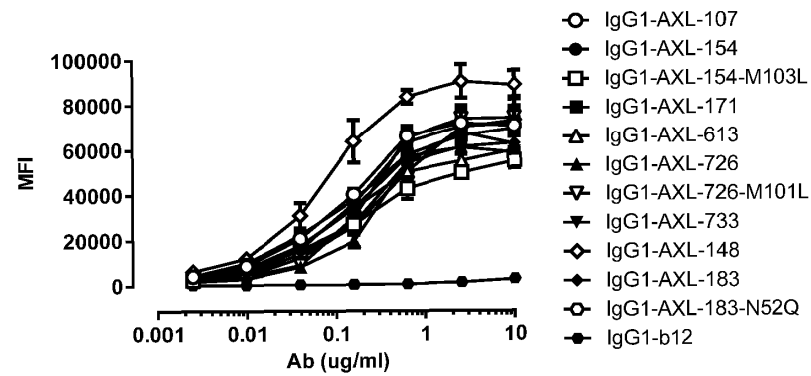
28. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde anticuerpo se une a un epítipo en AXL en donde el epítipo es reconocido por cualquiera de los anticuerpos definidos en la reivindicación 19.
- 5 29. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de AXL, comprendiendo o requiriendo el epítipo uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de AXL humana.
- 10 30. El ADC para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
31. El ADC para el uso de la reivindicación 30, en donde isotipo es IgG1, opcionalmente el alotipo IgG1m(f).
- 15 32. El ADC de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo monoclonal completo, tal como un anticuerpo IgG1,k monoclonal completo.
33. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde el anticuerpo es un anticuerpo que carece de la función efectora, un anticuerpo IgG4 estabilizado o un anticuerpo monovalente.
- 20 34. El ADC para el uso de la reivindicación 33, en donde la cadena pesada se ha modificado de modo que se ha eliminado toda la región bisagra.
35. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 33 y 34, en donde la secuencia del anticuerpo se ha modificado de modo que no comprende ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.
- 25 36. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 30 37. El ADC para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y una segunda región de unión que se une a una diana o epítipo diferentes que la primera región de unión.

Figura 1

A



B



C

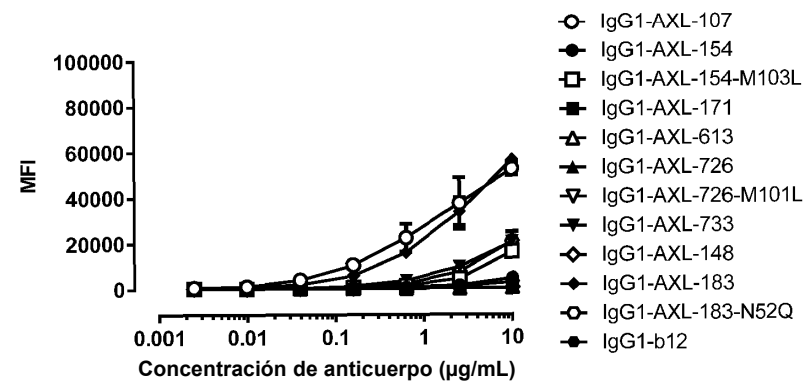


Figura 2

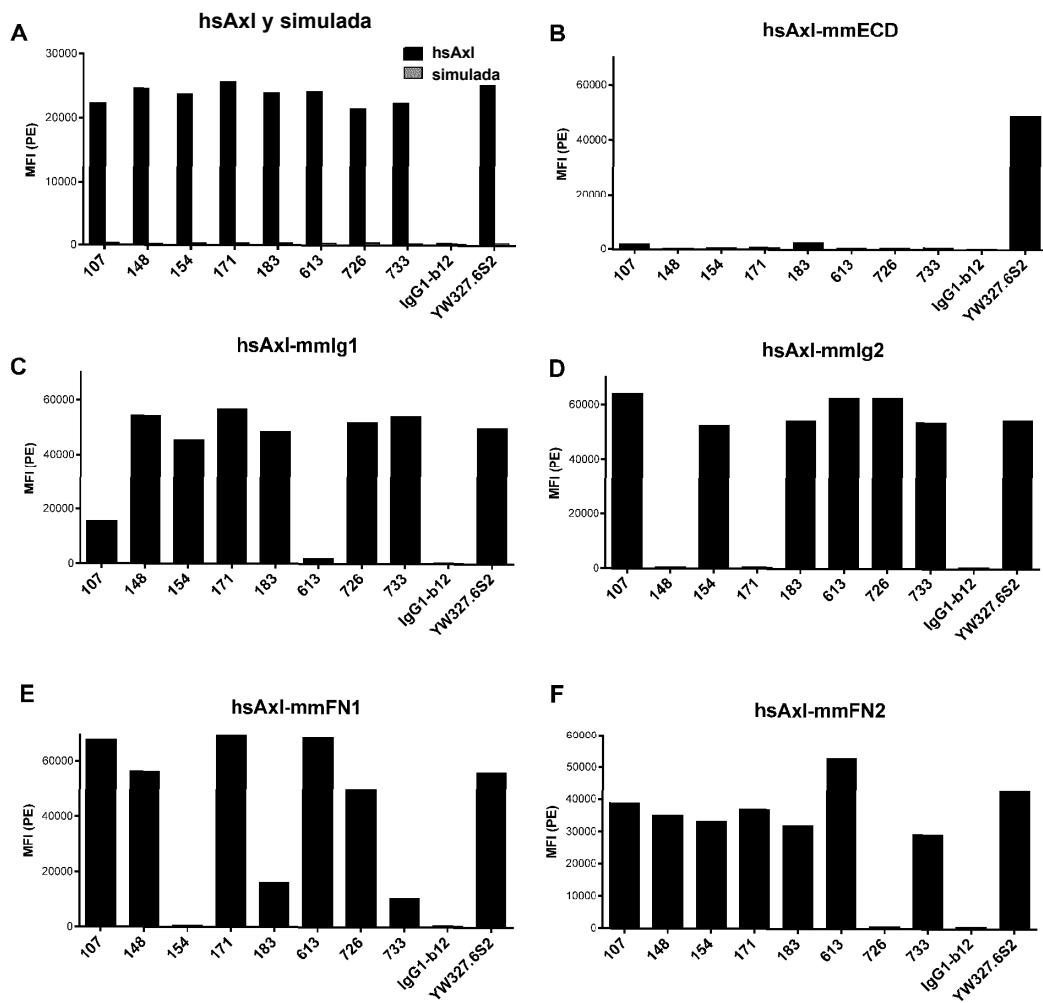


Figura 3

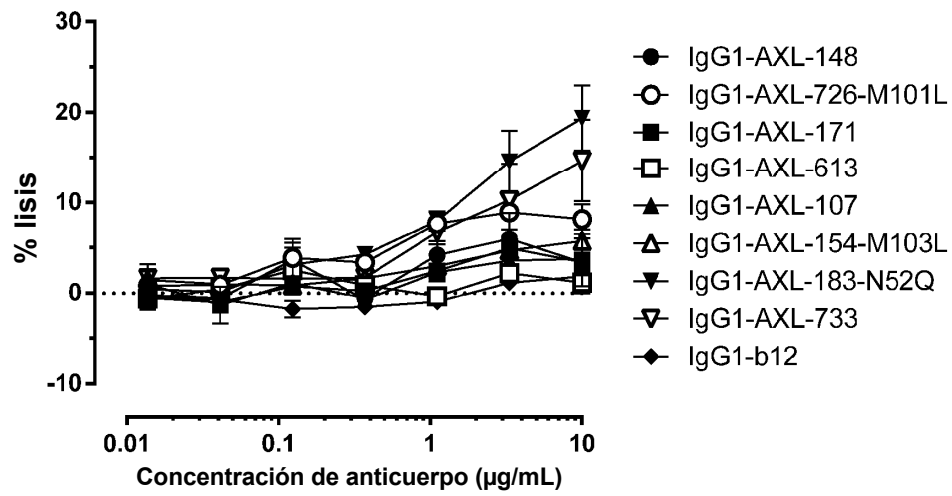


Figura 4

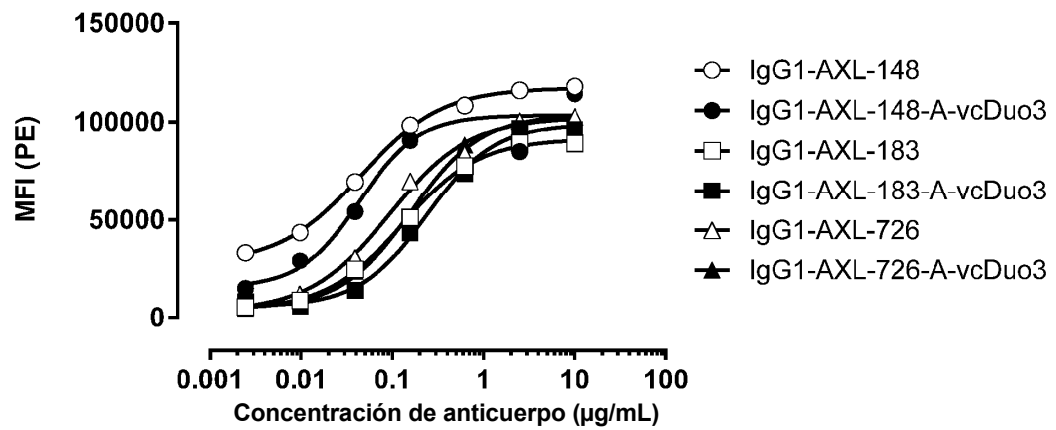
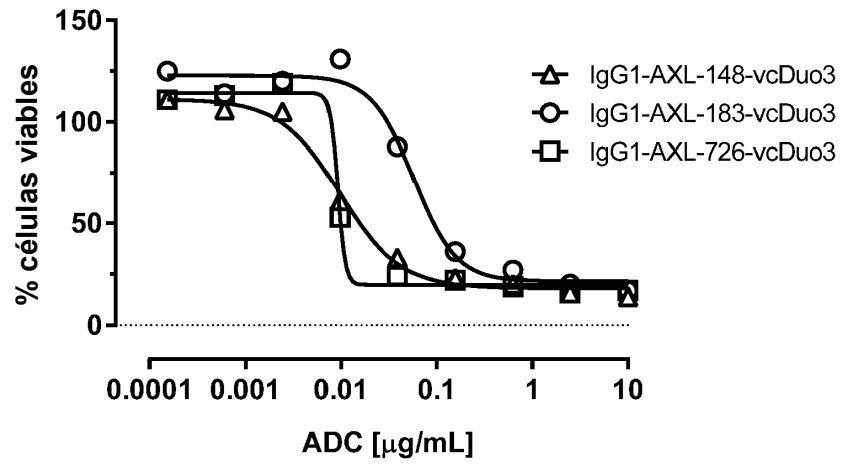


Figura 5

A



B

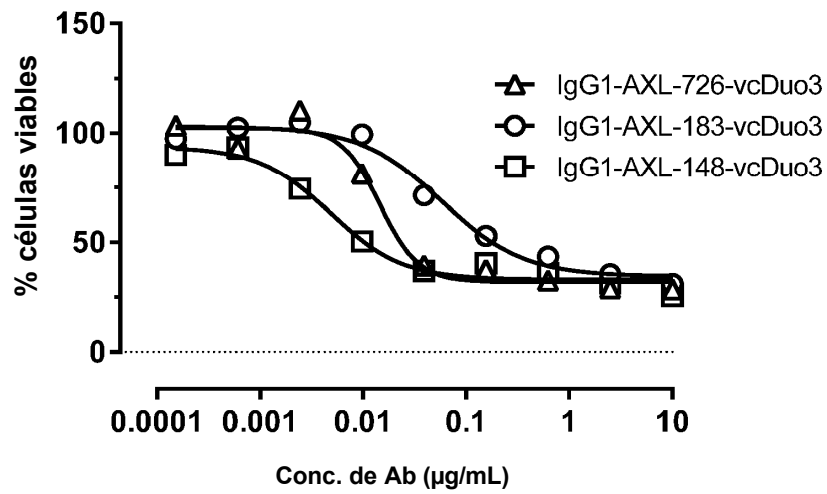


Figura 6

A

HC-IgG1-AXL-140
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTWVRQAPGKGLEWYSALISGSGSTFYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQNMSLRADDTAVYFCRGYSGYVYDAFDITWGQGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-148
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTWVRQAPGKGLEWYSALISGSGSTFYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQNMSLRADDTAVYFCRGYSGYVYDAFDITWGQGTMTVSS

CDR1

CDR2

CDR3

B

HC-IgG1-AXL-187
QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGSFSGYAMSWIRQPPGKGLEWIGEISHSGRTNYPNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSSTVTAADTAVVYCAEFITMIRGHIITHFYWGQGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-726
QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCAVYGGSFSGYAMSWIRQPPGKGLEWIGEISHSGRTNYPNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSSTVTAADTAVVYCAEFITMIRGHIITHFYWGQGTMTVSS

CDR1

CDR2

CDR3

C

HC-IgG1-AXL-171
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQNMSLRADDTAVVYCAKEGYIWFGESLSYAFDITWGQGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-172
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQNMSLRADDTAVVYCAKEGYIWFGESLSYAFDITWGQGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-181
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISVSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQNMSLRADDTAVVYCAKEGYIWFGESLSYAFDITWGQGTMTVSS

CDR1

CDR2

CDR3

D

HC-IgG1-AXL-608-01
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASKAGGTFSYATMVRQAPGOGLEWMGRIITPIFGINLVQKQGRVITADKSTSTAYMELSSLRAEDTAVVYCARRGDIYGGSGSPDVFIDINGOGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-610-01
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASKAGGTFSYATMVRQAPGOGLEWMGRIITPIFGINLVQKQGRVITADKSTSTAYMELSSLRAEDTAVVYCARRGDIYGGSGSPDVFIDINGOGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-613
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASKAGGTFSYATMVRQAPGOGLEWMGRIITPIFGINLVQKQGRVITADKSTSTAYMELSSLRAEDTAVVYCARRGDIYGGSGSPDVFIDINGOGTMTVSS
HC-IgG1-AXL-620-06
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASKAGGTFSYATMVRQAPGOGLEWMGRIITPIFGINLVQKQGRVITADKSTSTAYMELSSLRAEDTAVVYCARRGDIYGGSGSPDVFIDINGOGTMTVSS

CDR1

CDR2

CDR3

E

LC-IgG1-AXL-613-08
EIVLTQSPFATLSSLPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYDINSRATGIPRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDEFAVYCCQQRSNWLTFFGSGTRMEIK
LC-IgG1-AXL-613
EIVLTQSPFATLSSLPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYDINSRATGIPRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDEFAVYCCQQRSNWLTFFGSGTRMEIK

CDR1

CDR2

CDR3

Figura 7

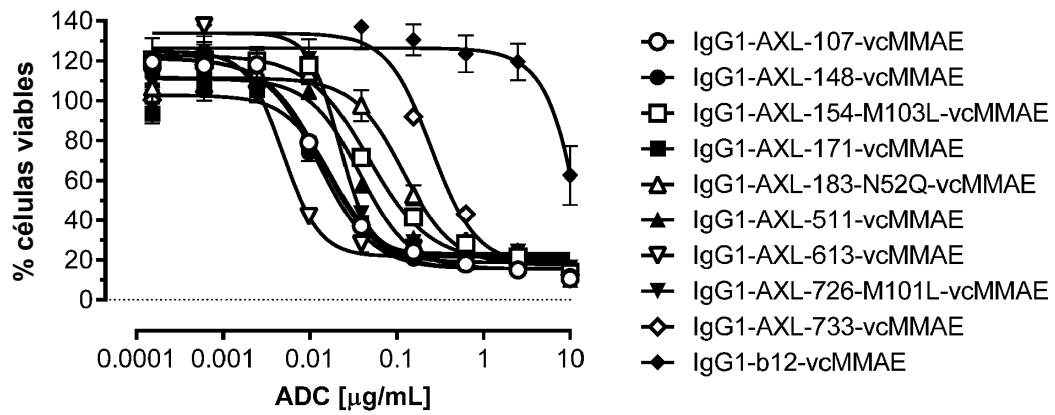


Figura 8

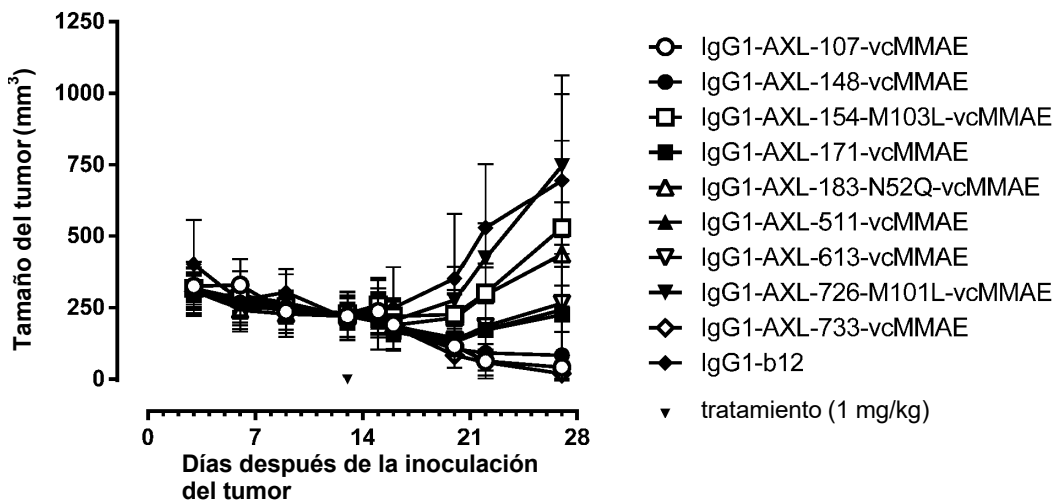


Figura 9

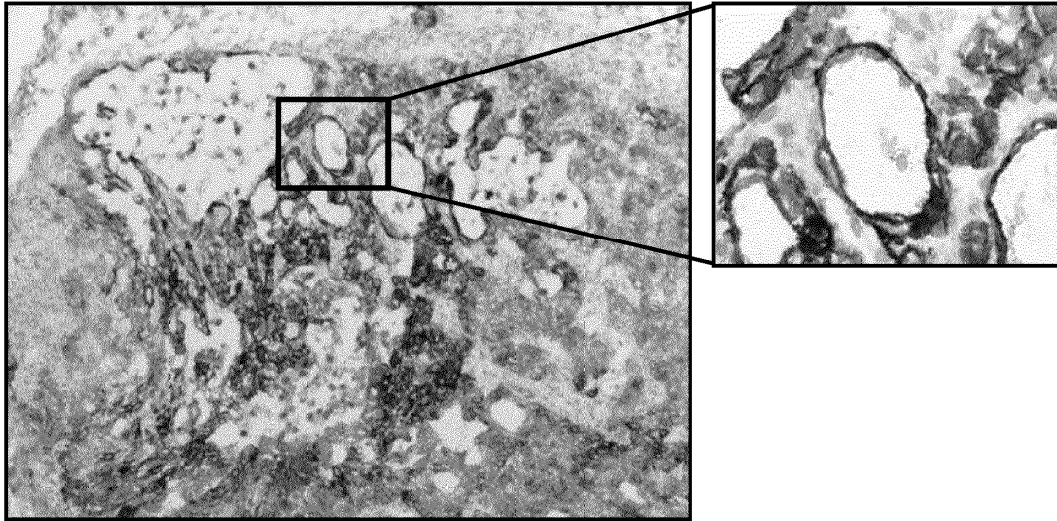
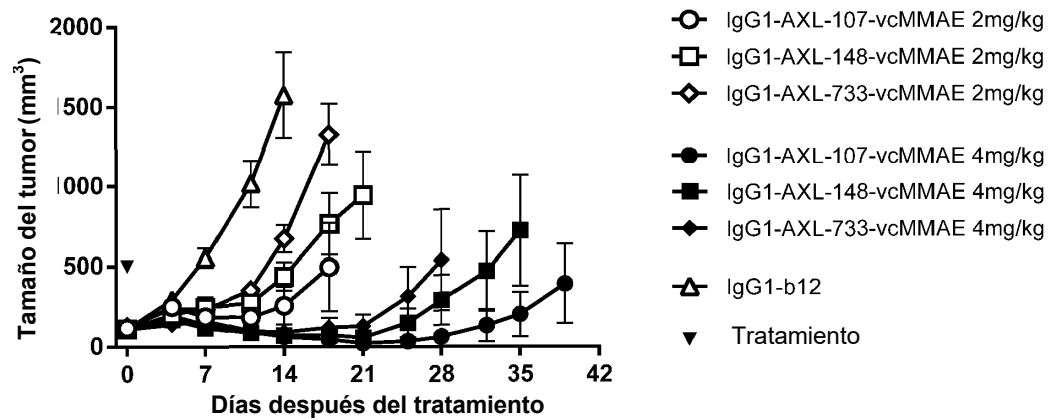


Figura 10

A



B

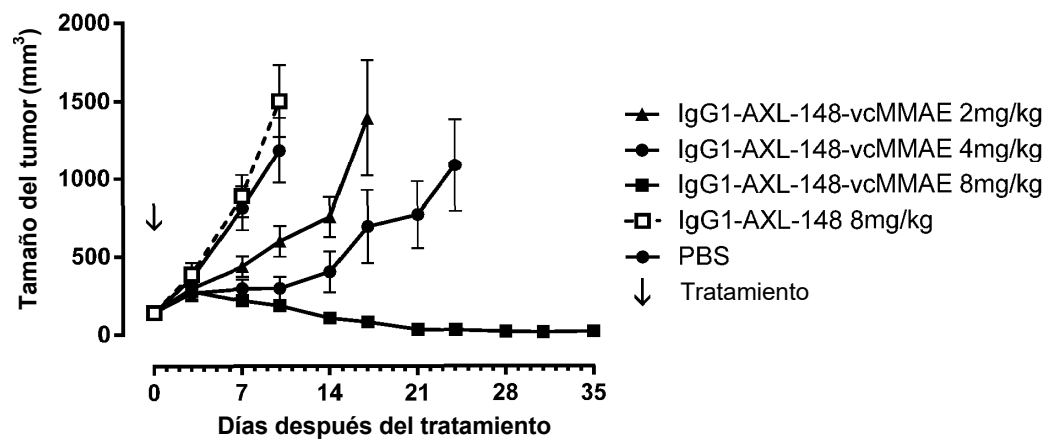


Figura 10 (continuación)

C

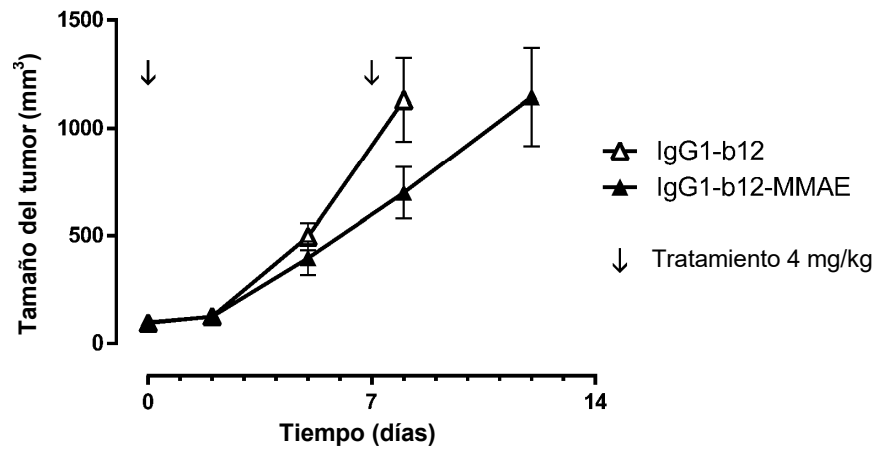


Figura 11

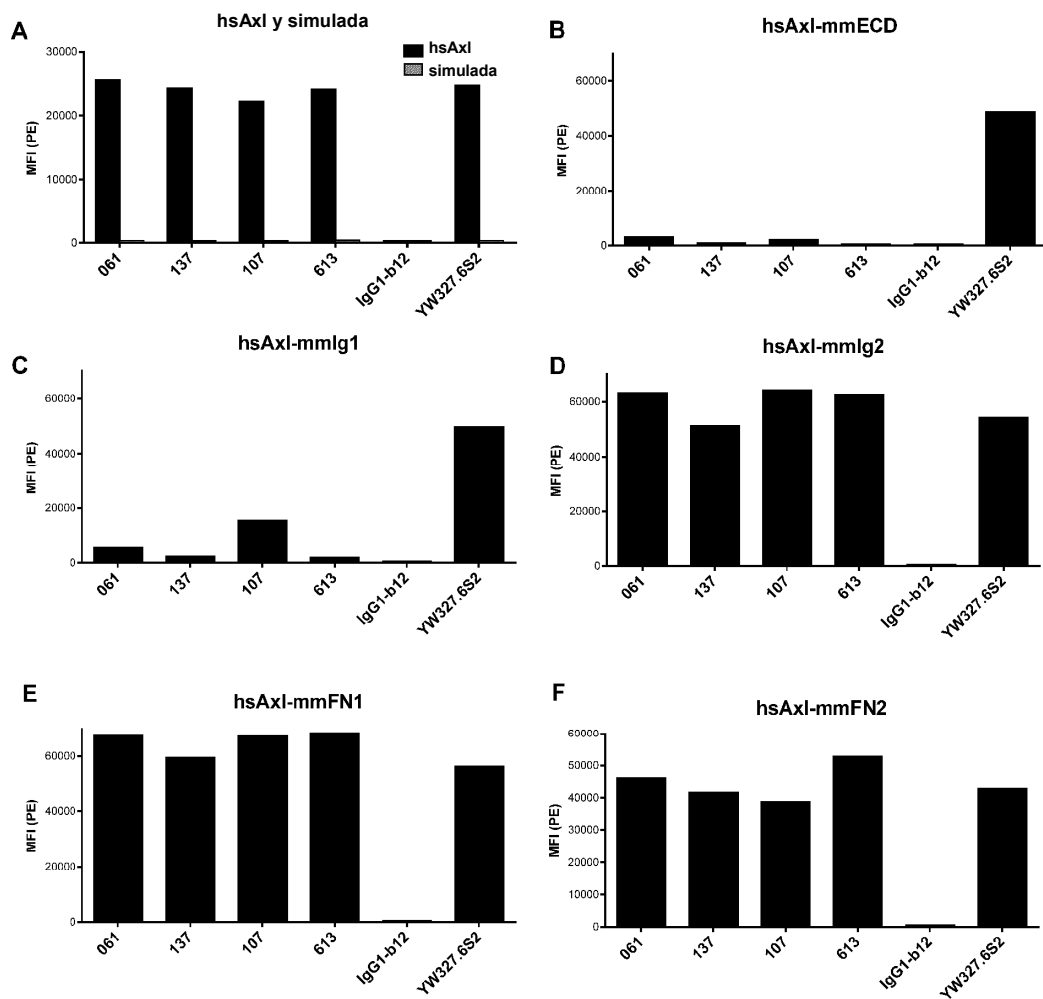


Figura 12

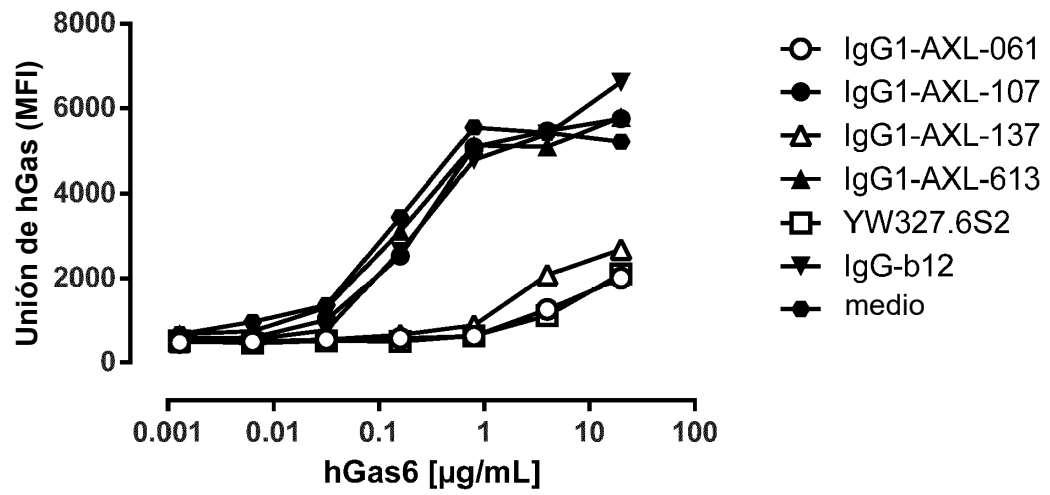
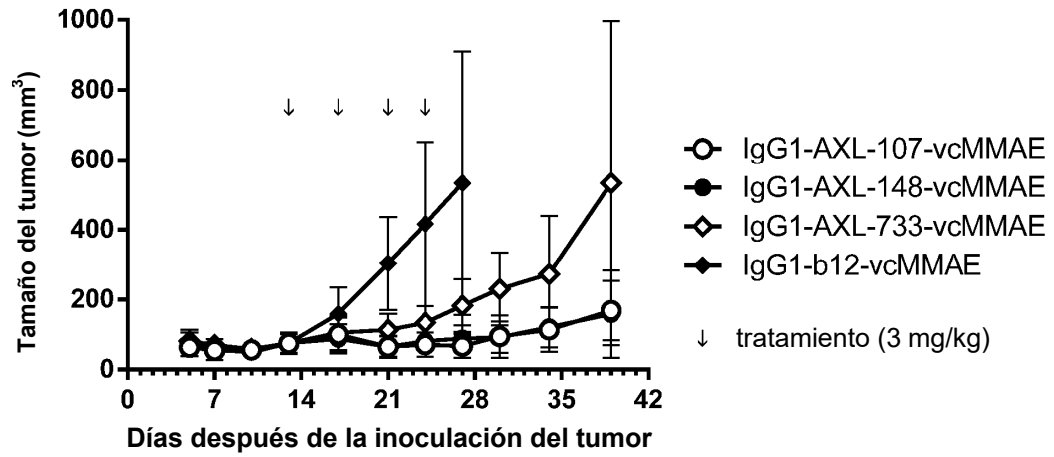


Figura 13

A



B

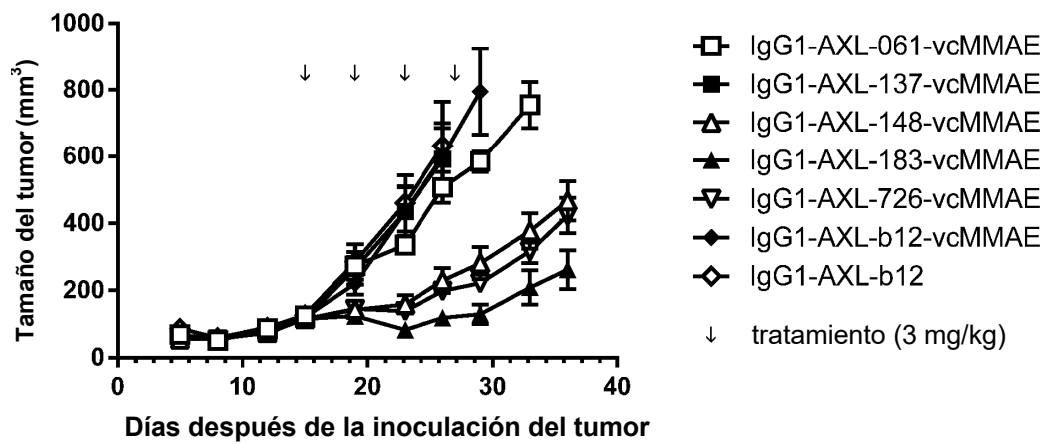
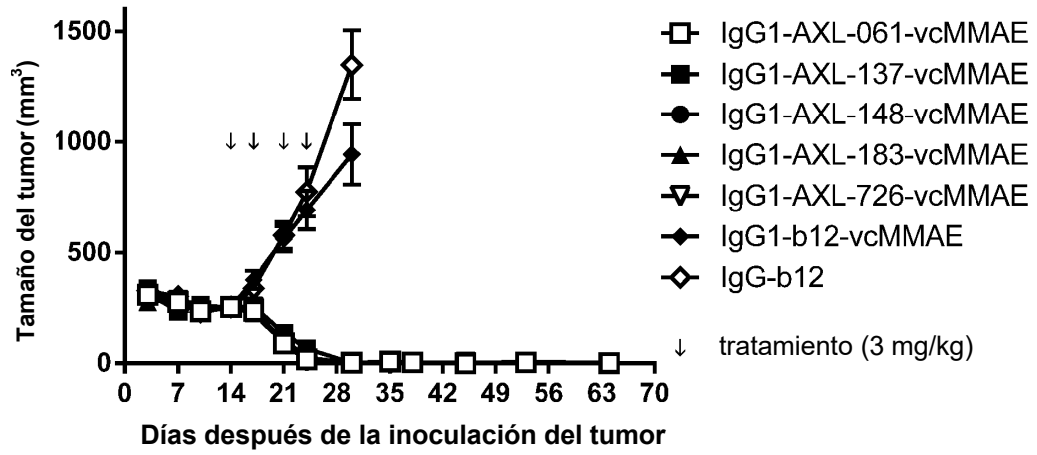


Figura 14

A



B

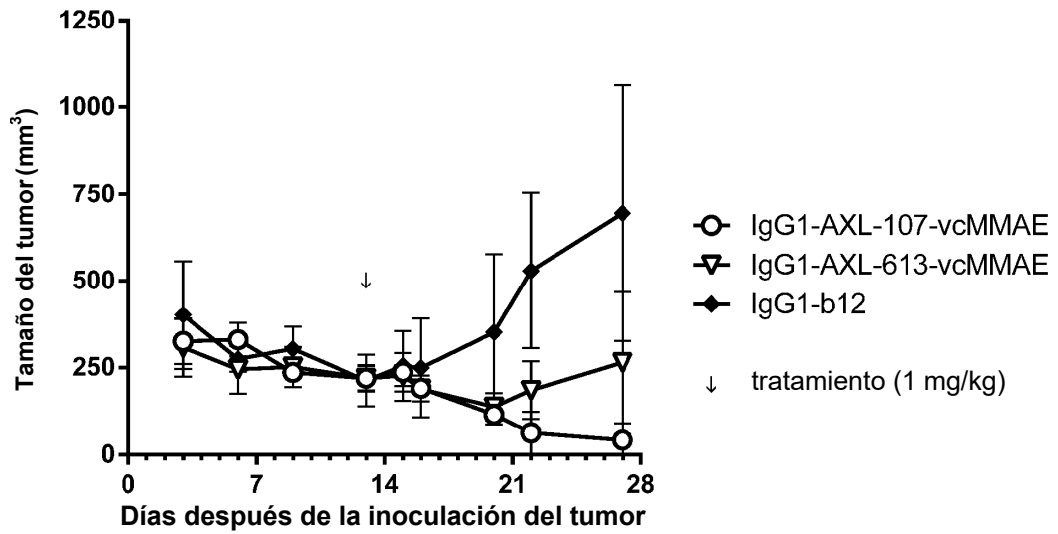
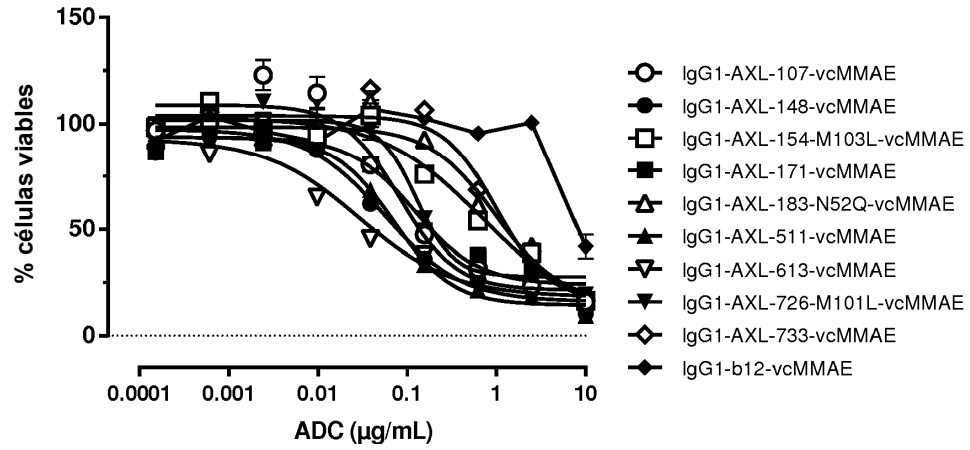


Figura 15

A



B

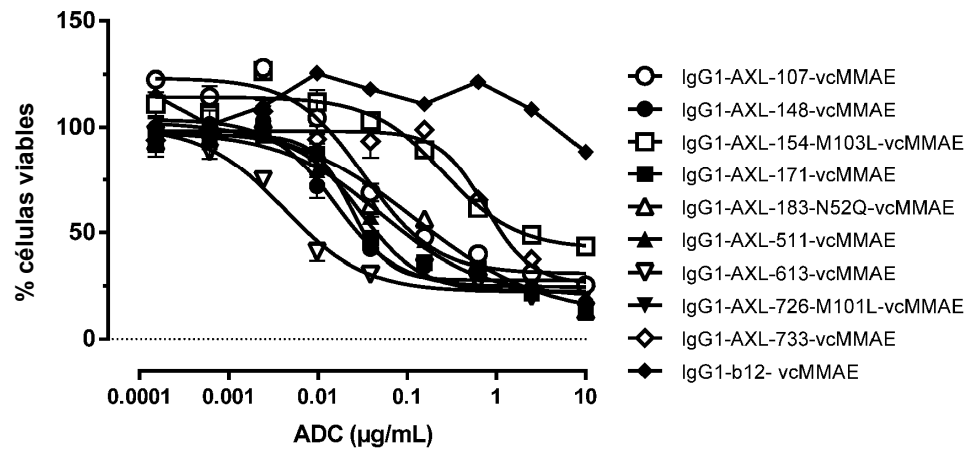


Figura 16

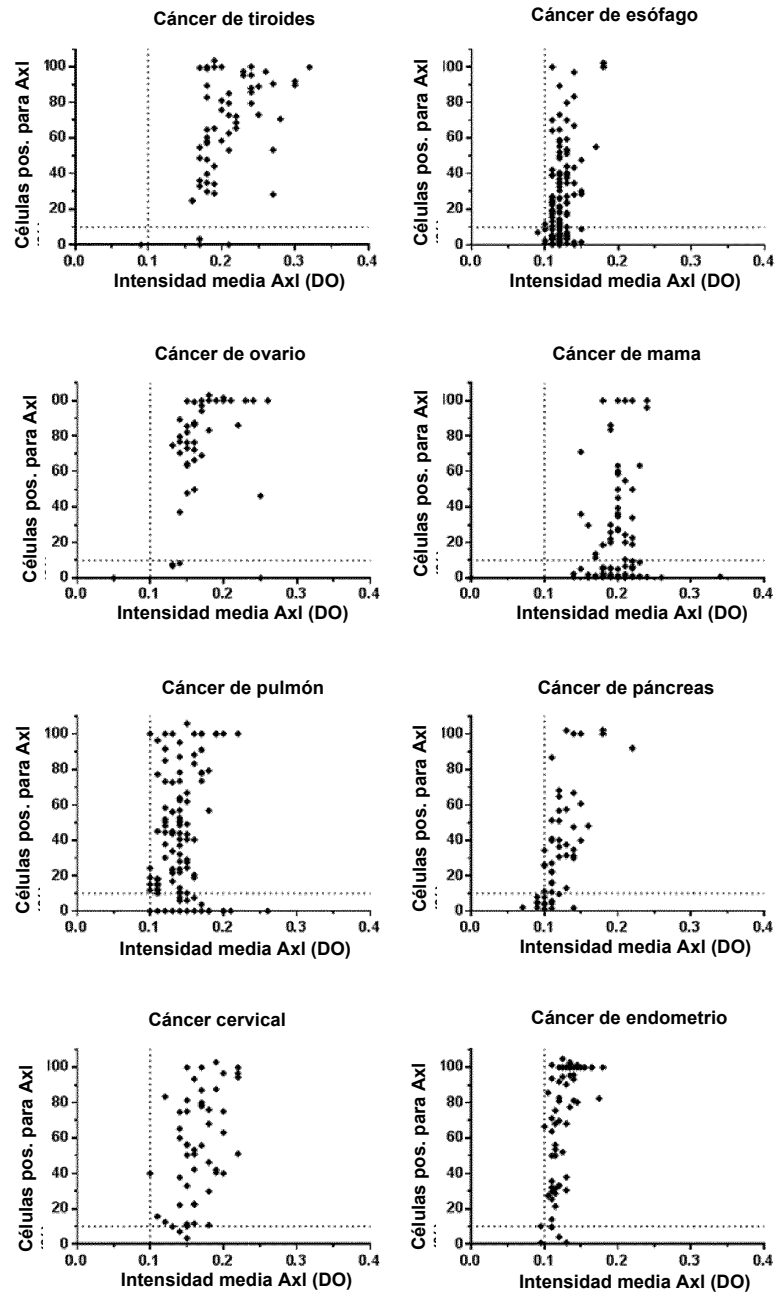
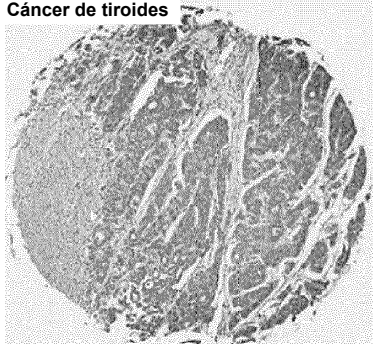


Figura 17

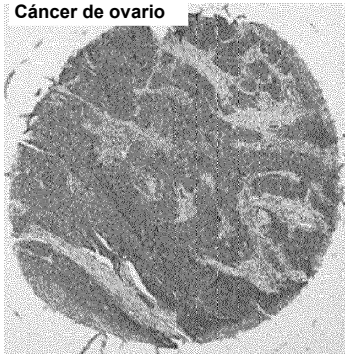
Cáncer de tiroides



Cáncer de esófago



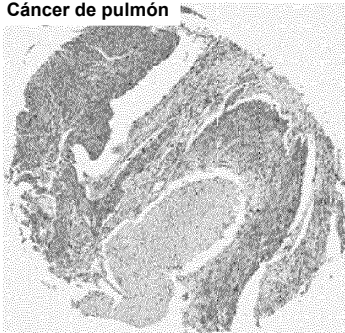
Cáncer de ovario



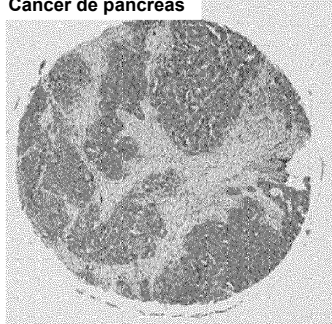
Cáncer de mama



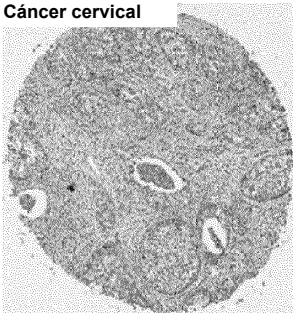
Cáncer de pulmón



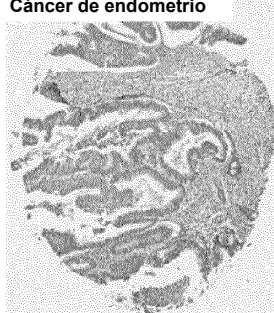
Cáncer de páncreas



Cáncer cervical



Cáncer de endometrio



Melanoma maligno

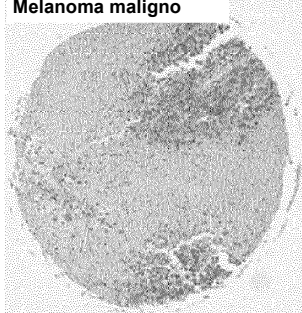


Figura 18

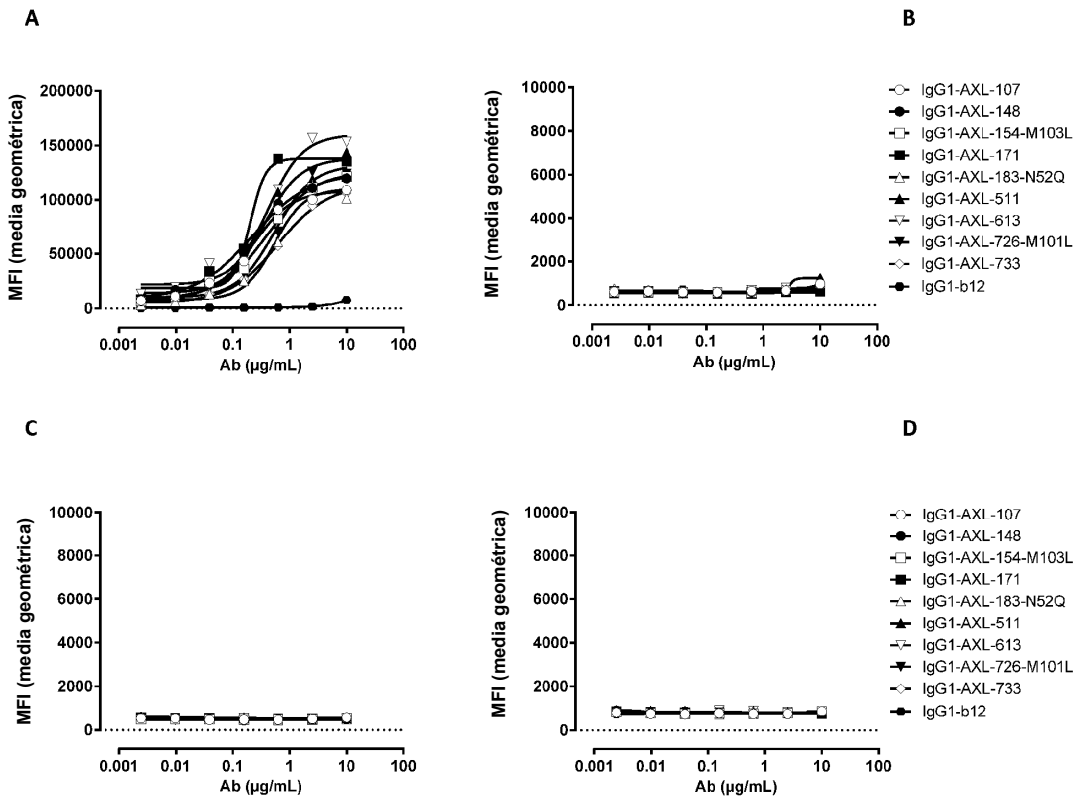
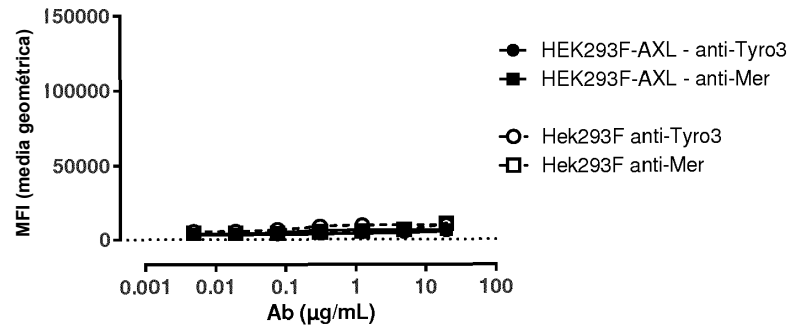
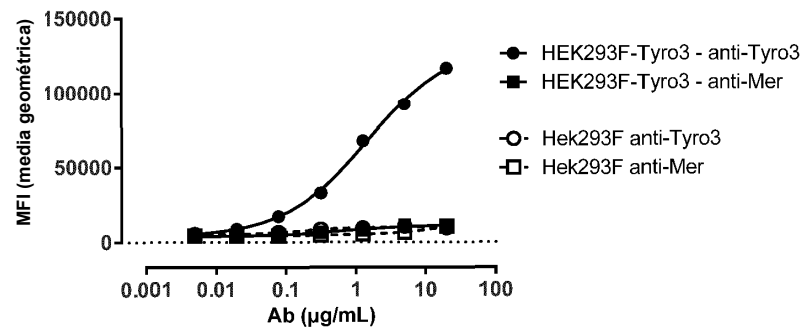


Figura 18 (continuación)

E



F



G

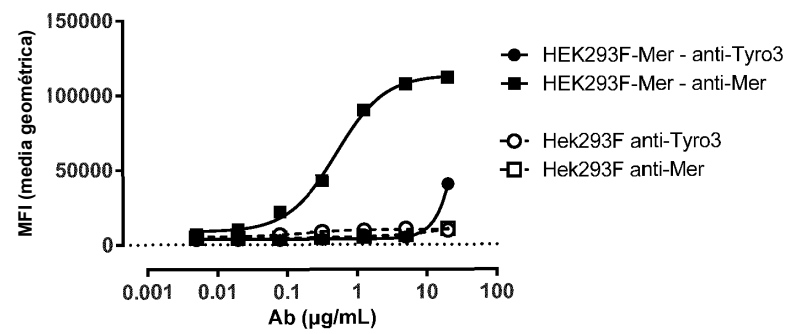


Figura 19

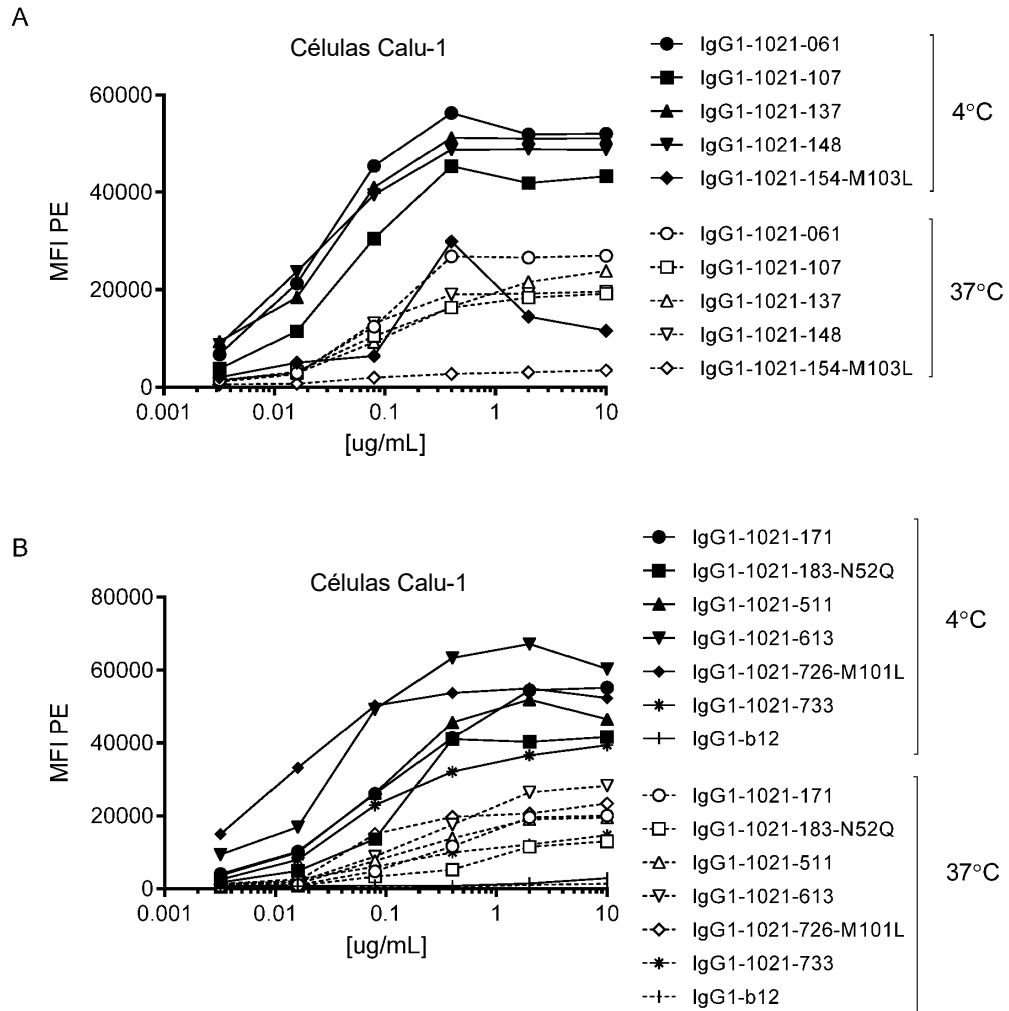


Figura 19 (continuación)

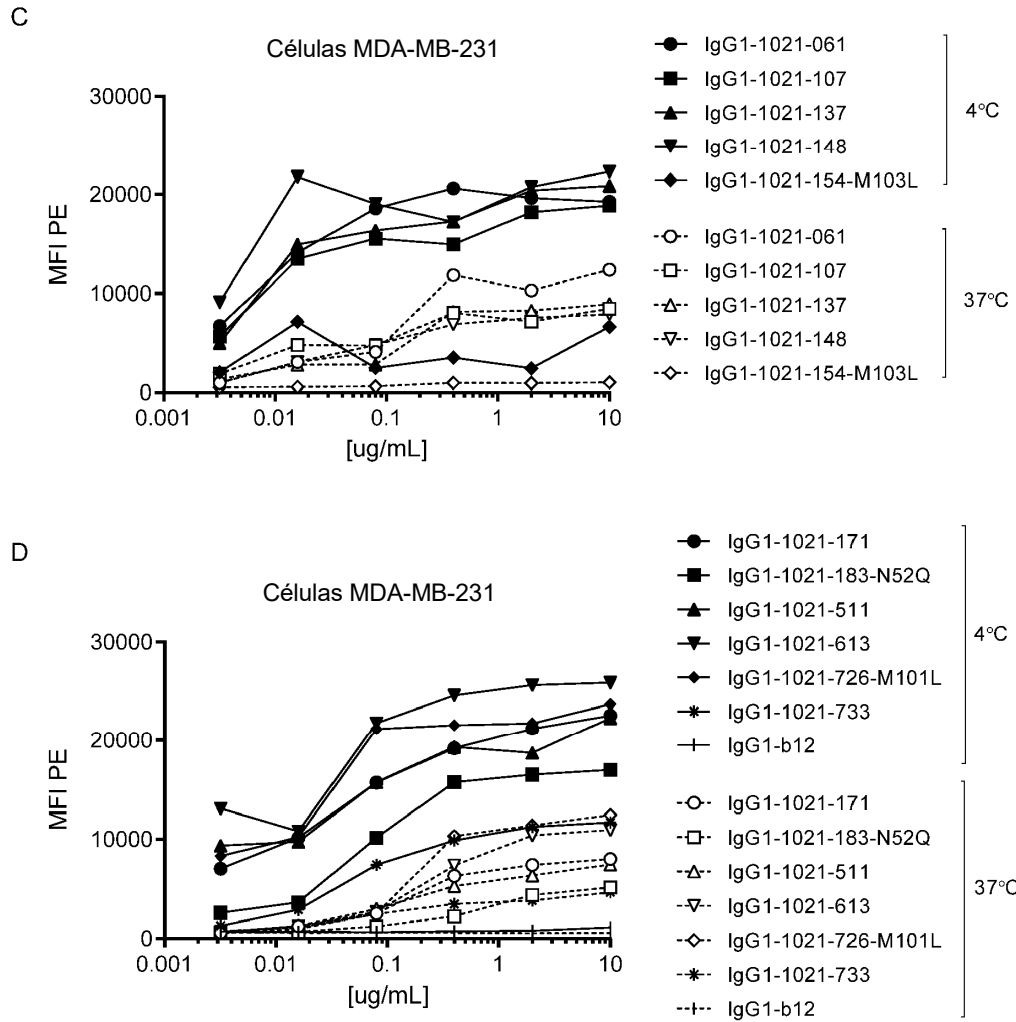


Figura 20

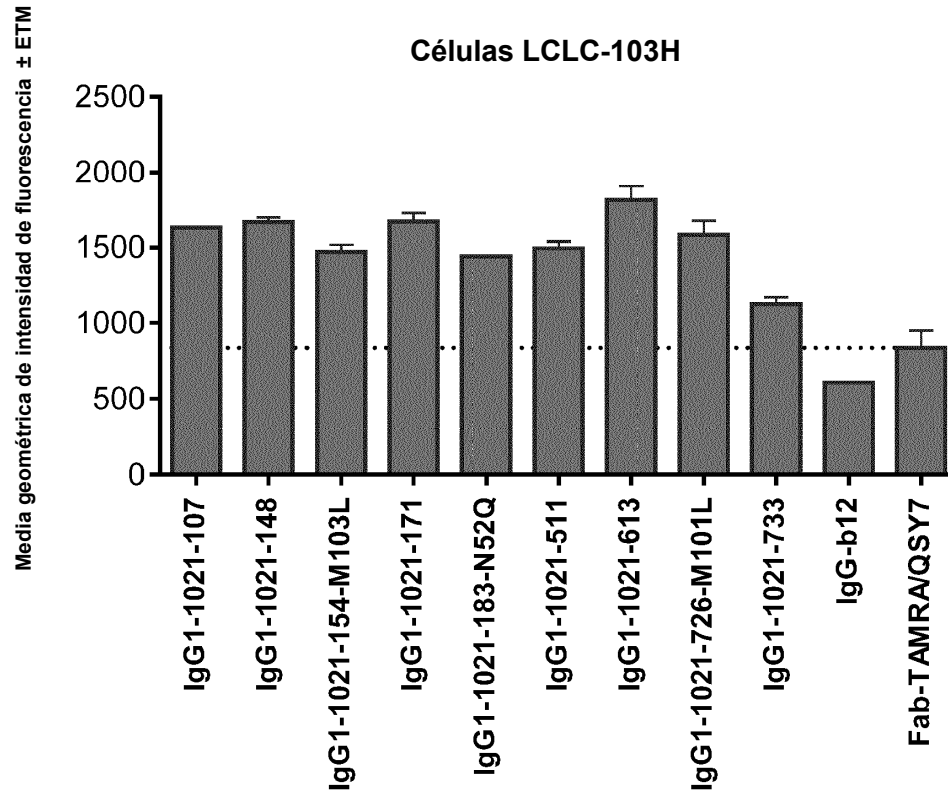
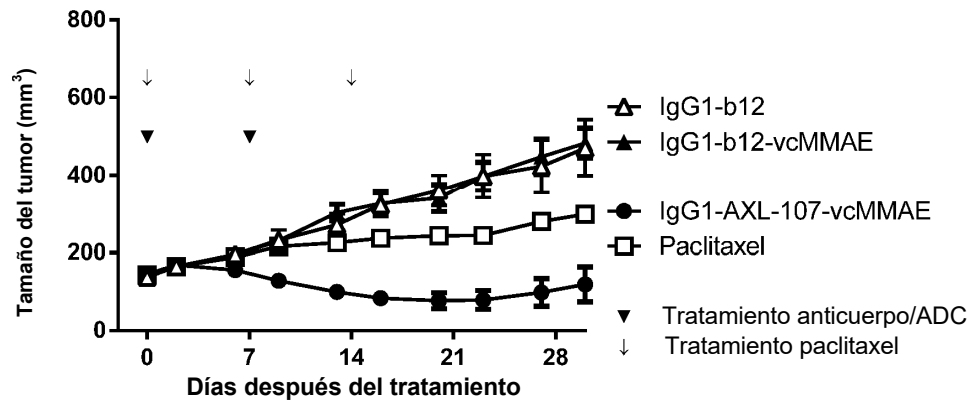


Figura 21

A



B

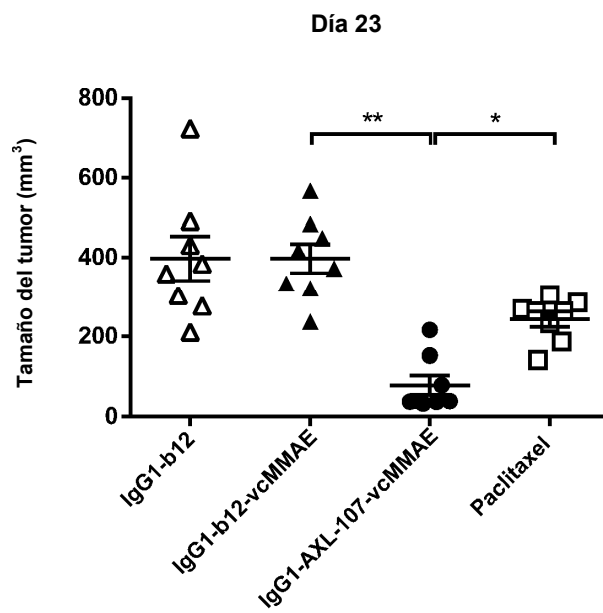
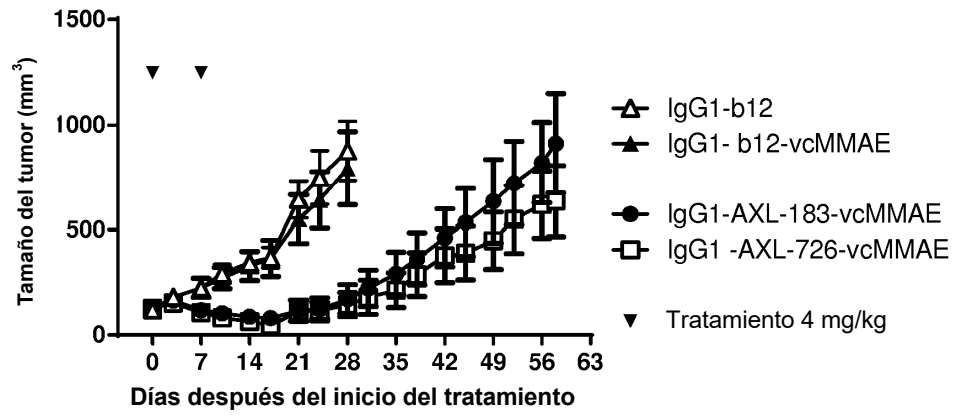


Figura 22

A



B

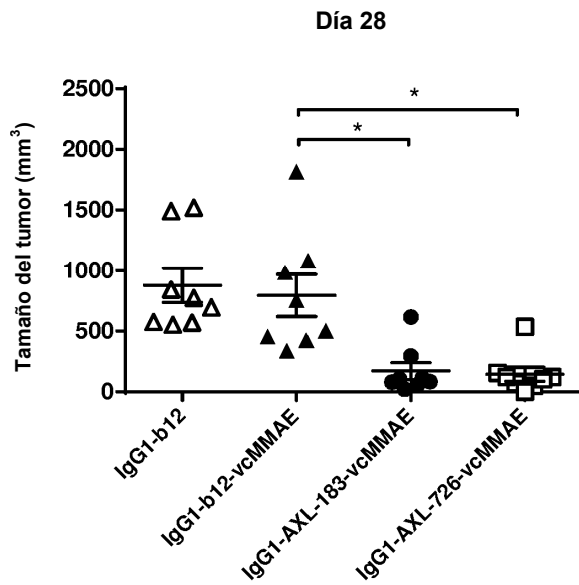
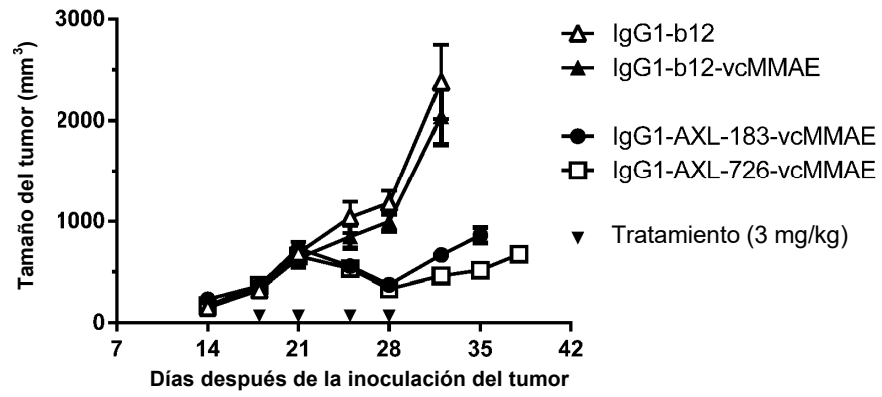


Figura 23

A



B

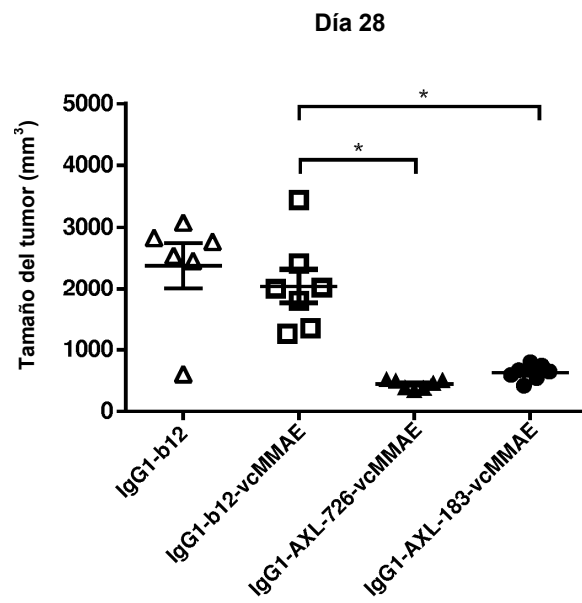


Figura 24

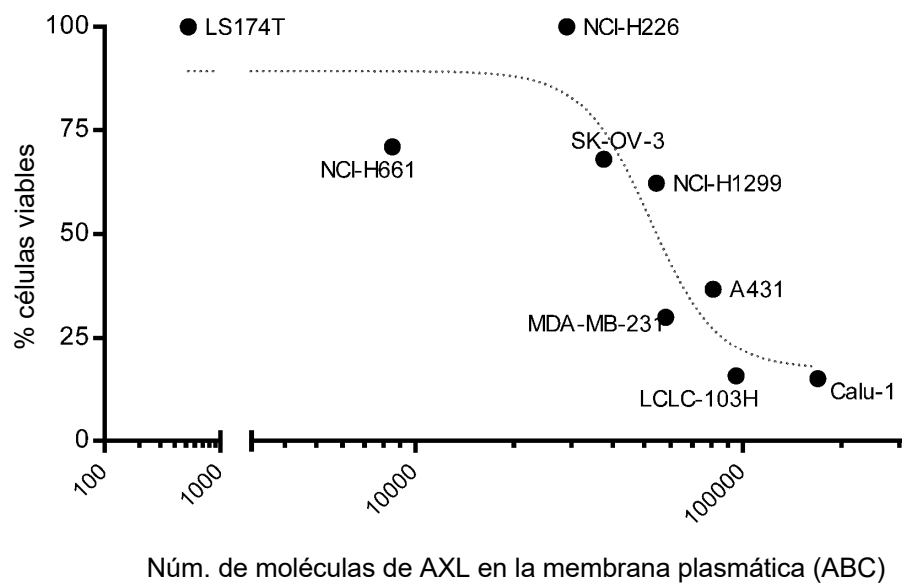
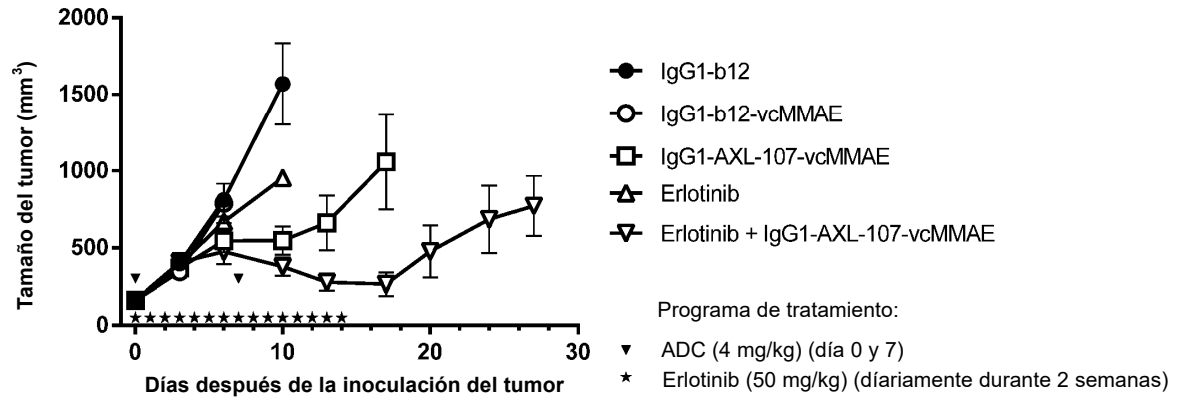
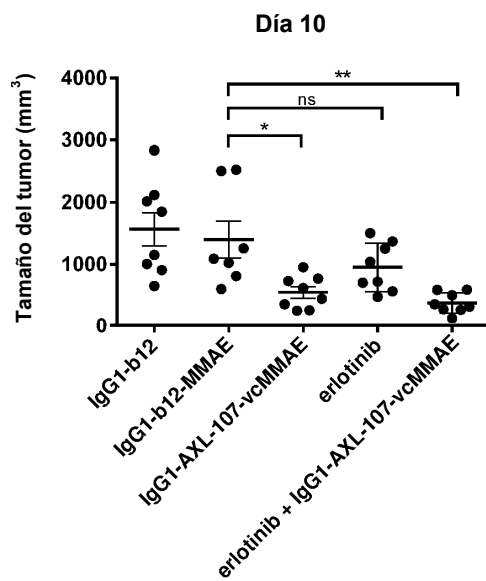


Figura 25

A



B



C

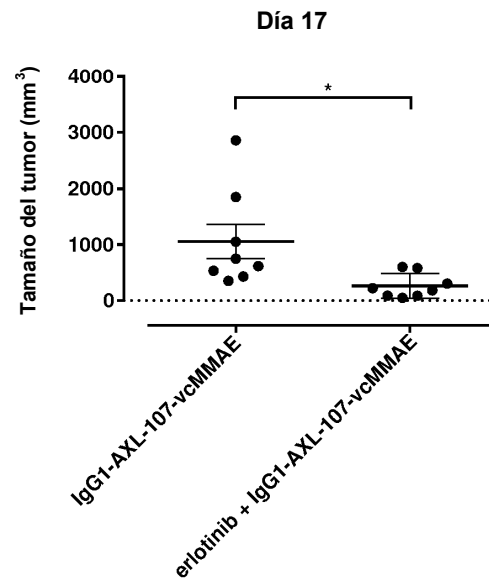
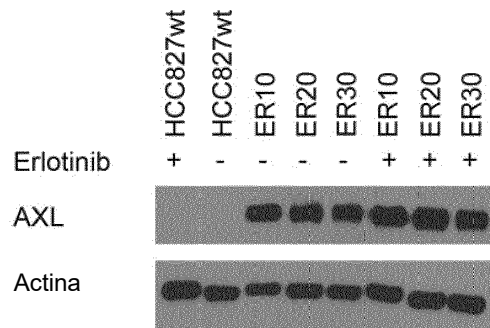


Figura 26

A.



B.

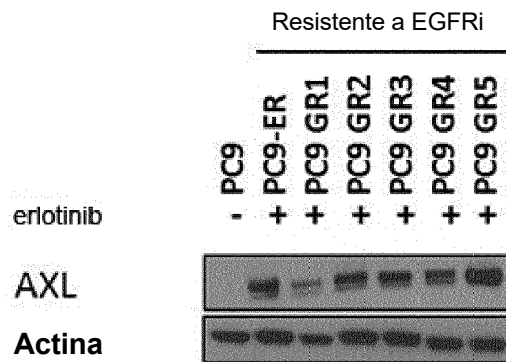
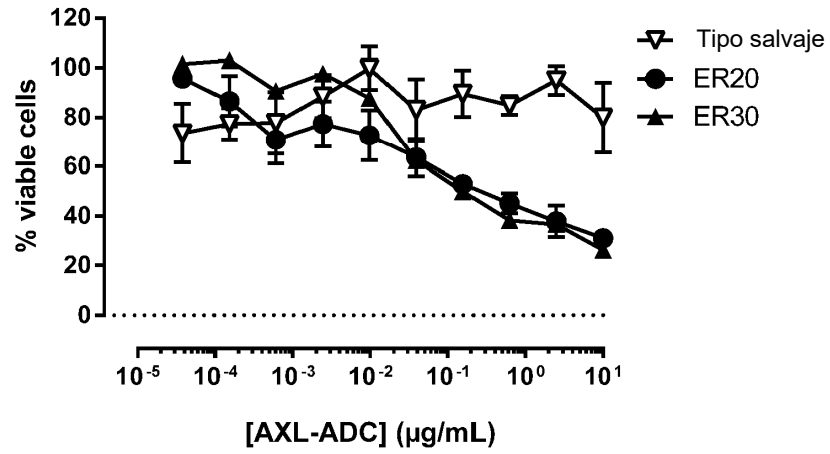


Figura 27

A. HCC827



B. PC9

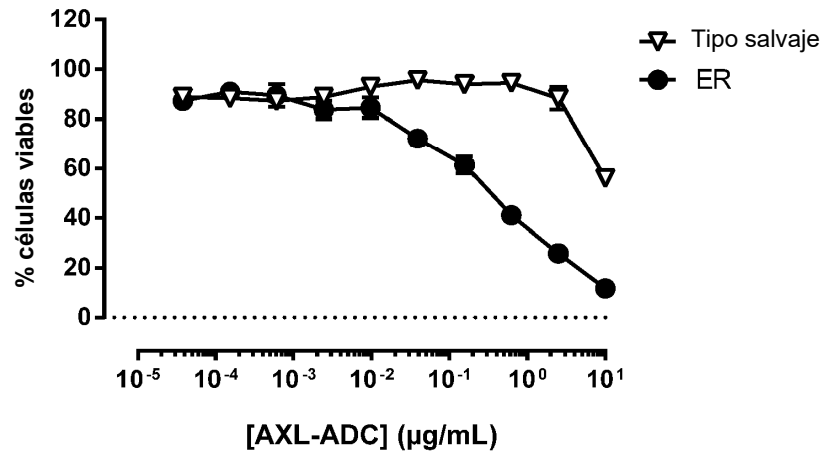
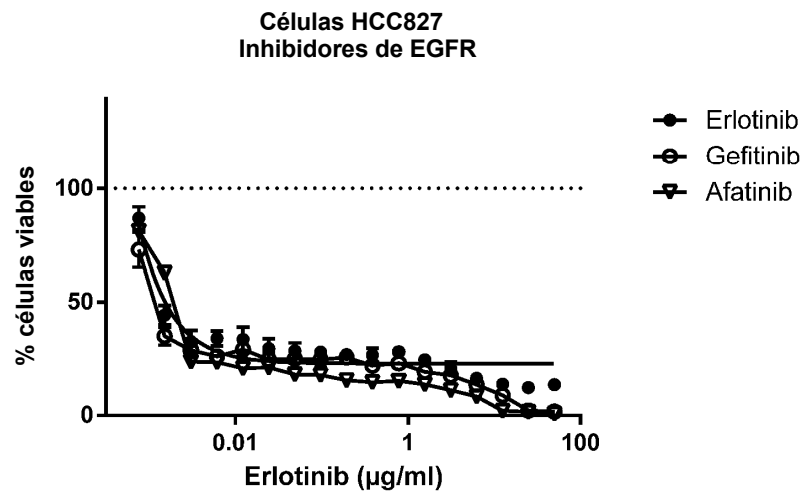


Figura 27 (continuación)

C



D

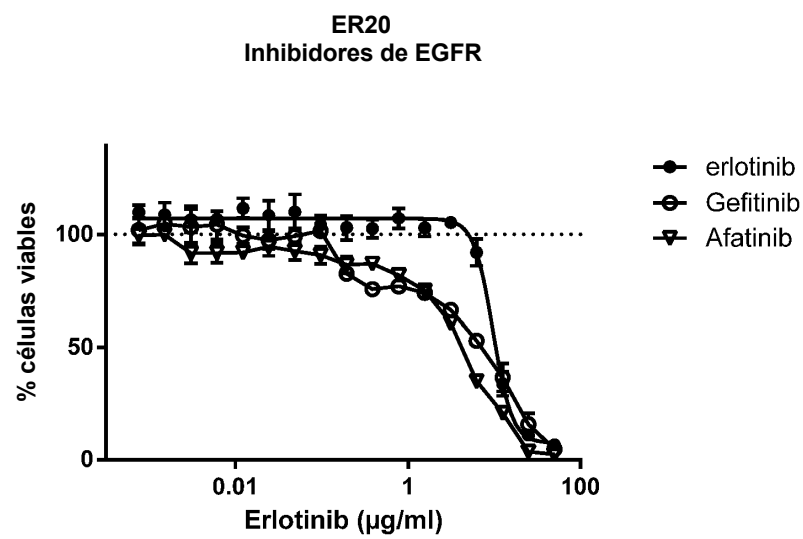
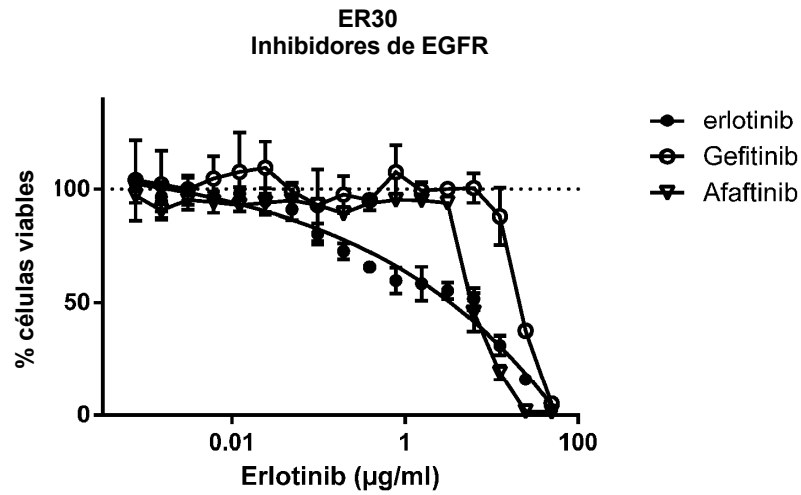


Figura 27 (continuación)

E



F

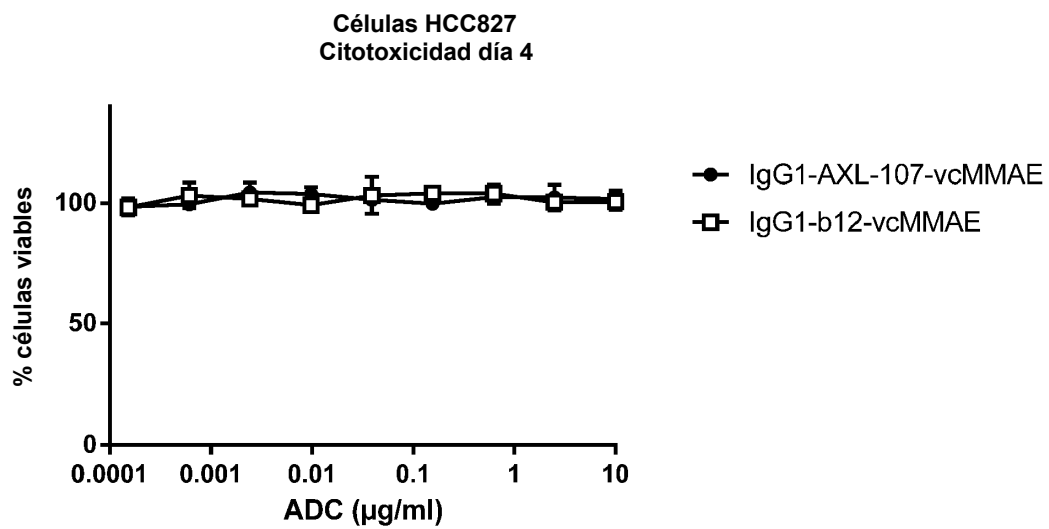
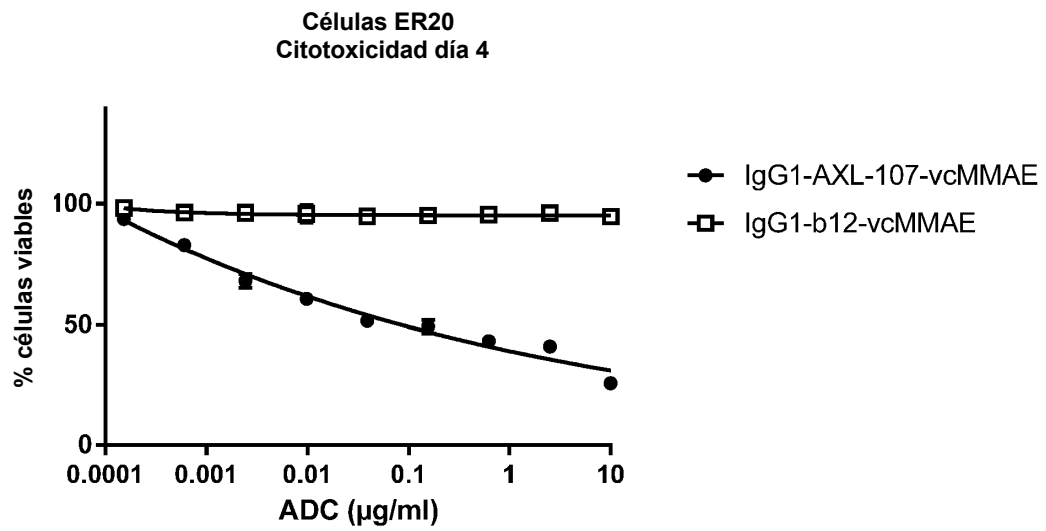


Figura 27 (continuación)

G



H

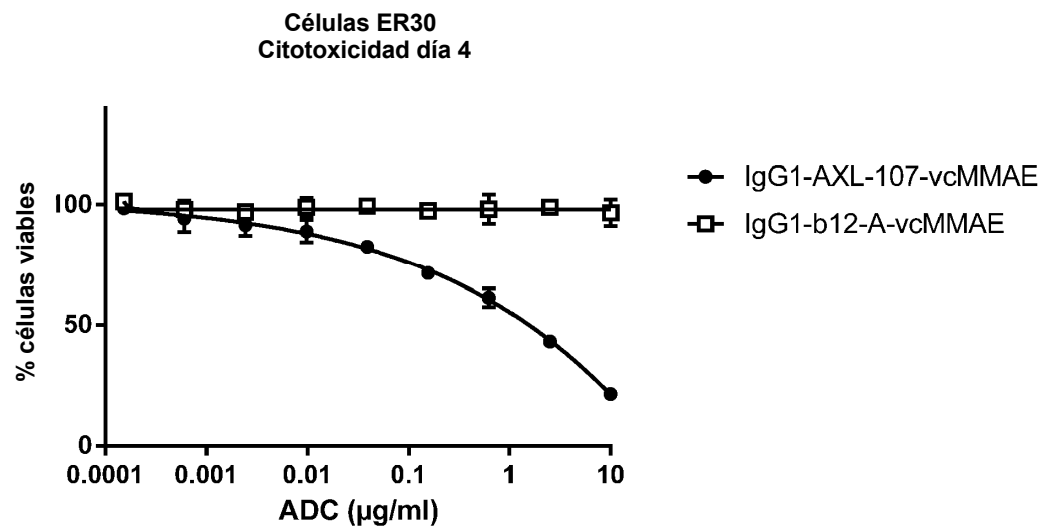
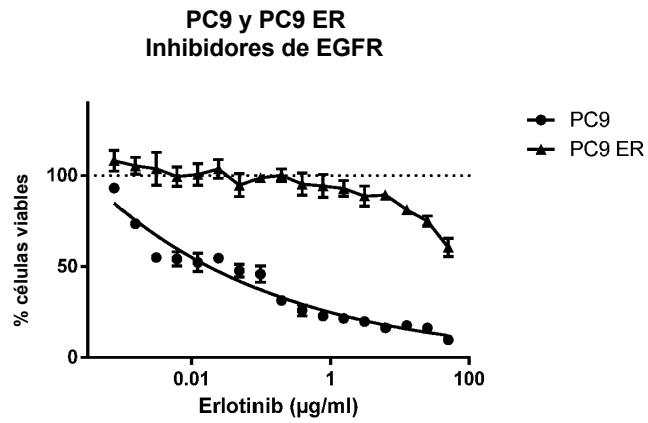
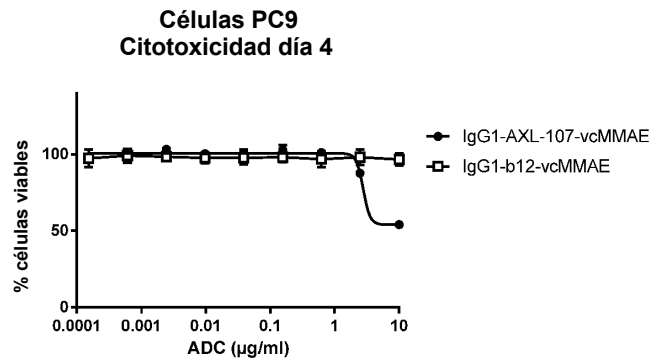


Figura 27 (continuación)

I



J



K

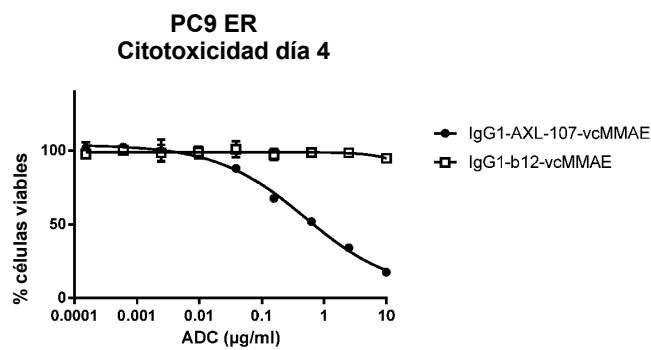
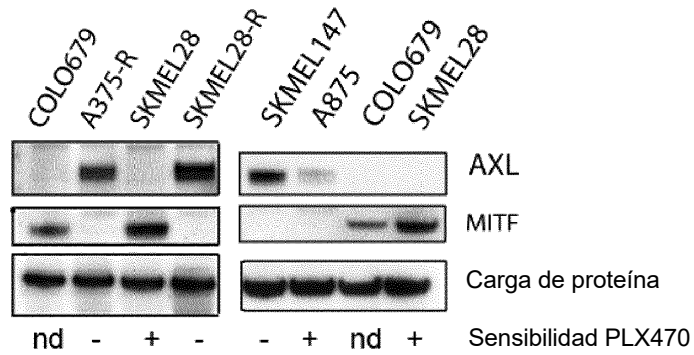


Figura 28

A



B

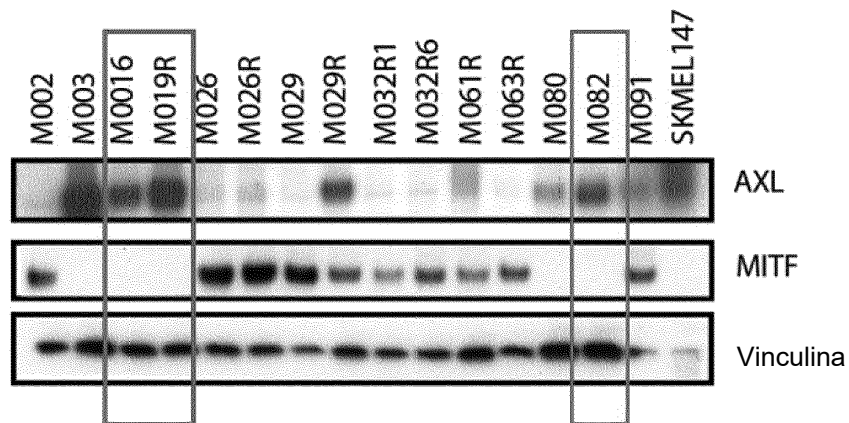


Figura 29

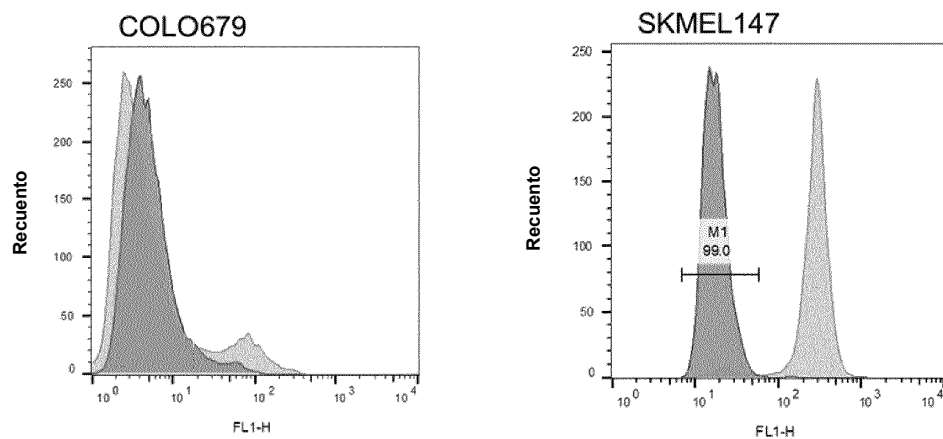


Figura 30

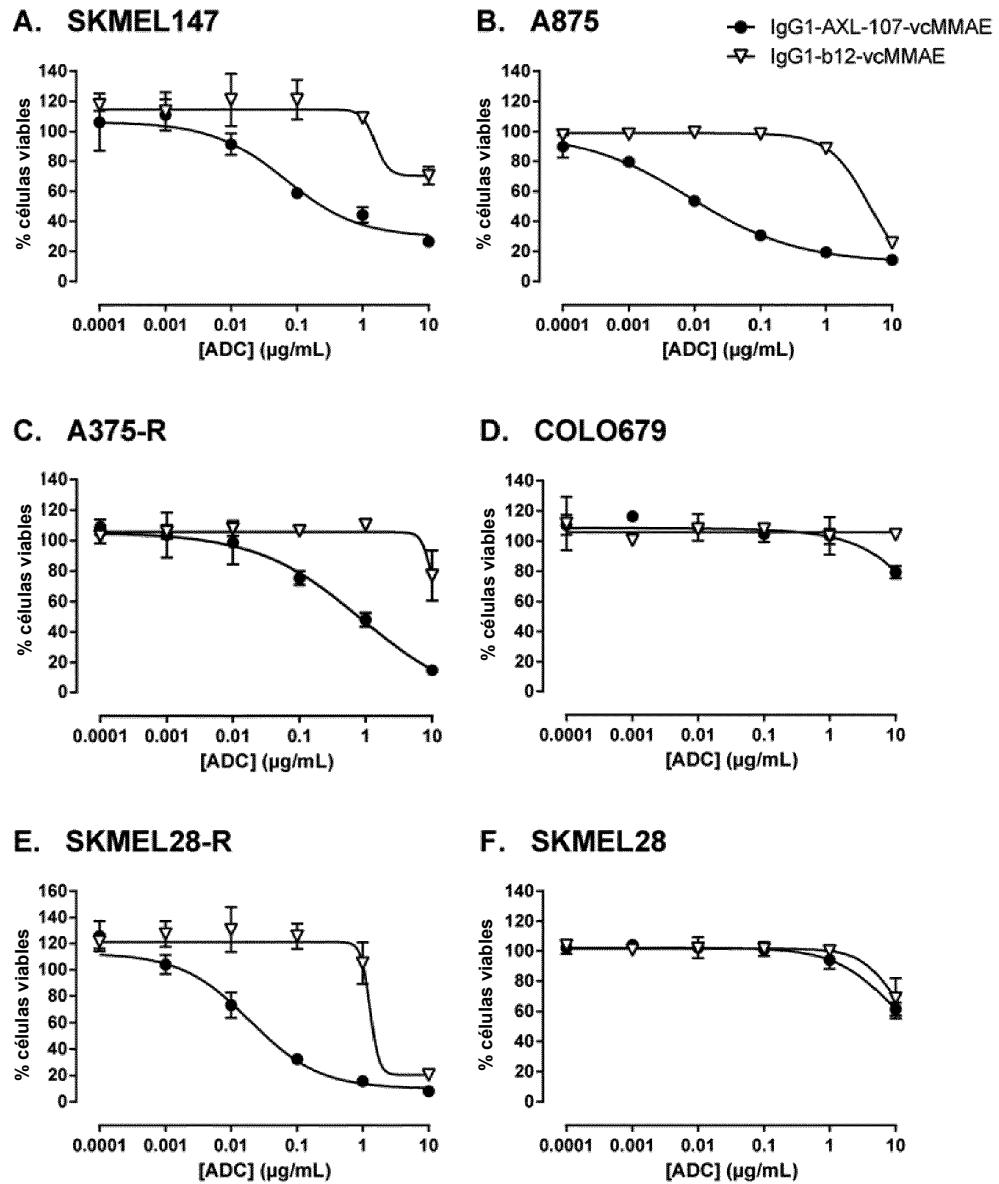


Figura 31

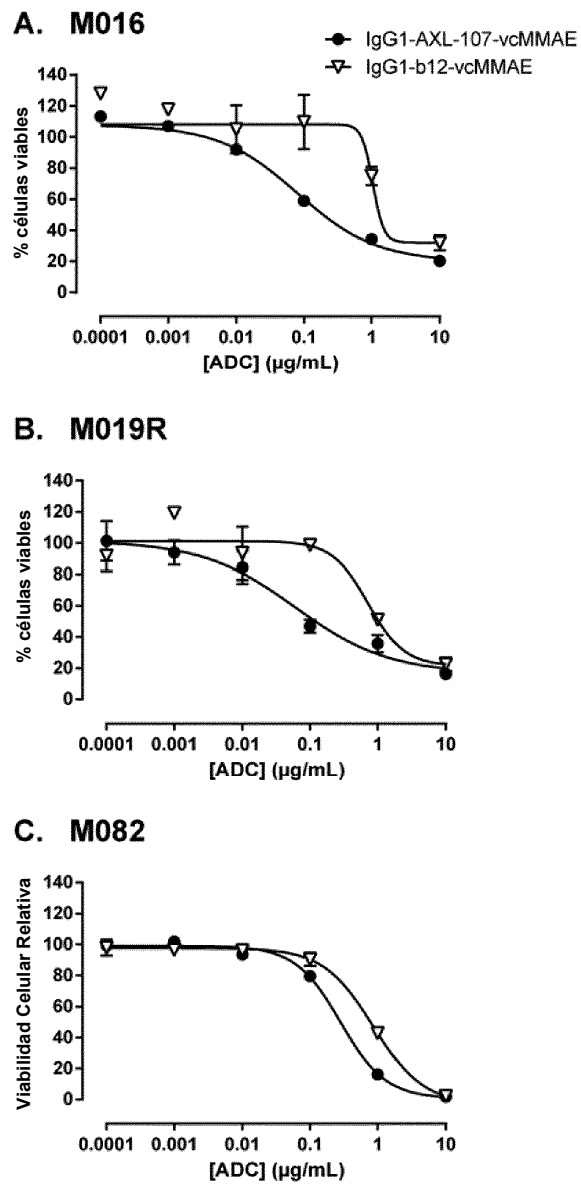
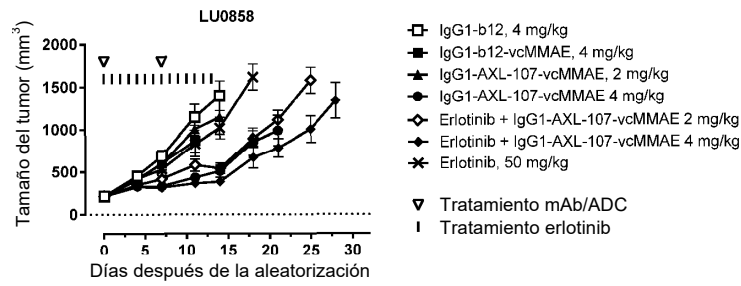
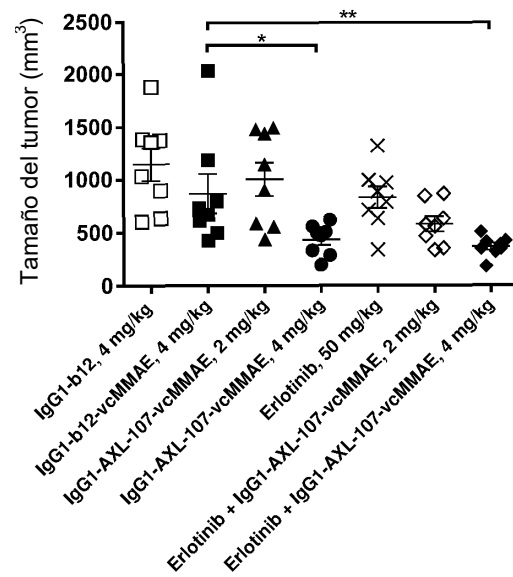


Figura 32

A



B



C

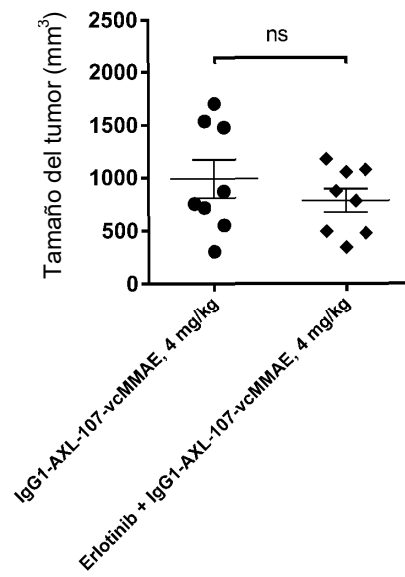
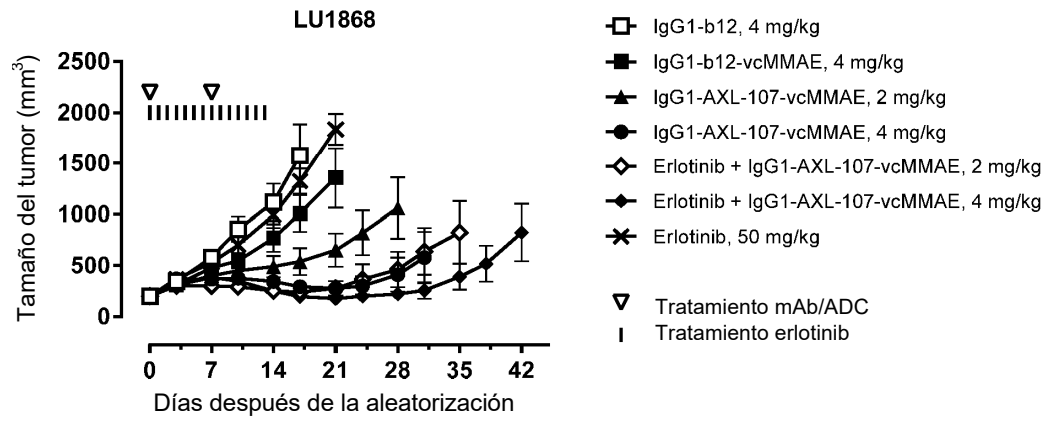


Figura 33

A



B

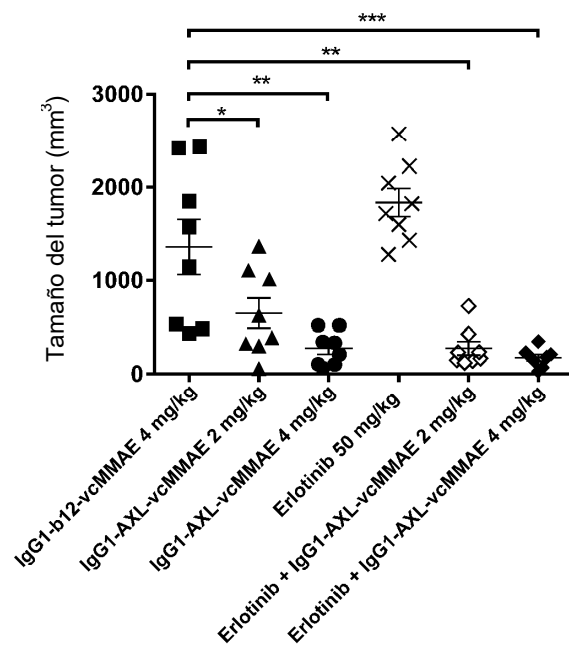


Figura 33 (continuación)

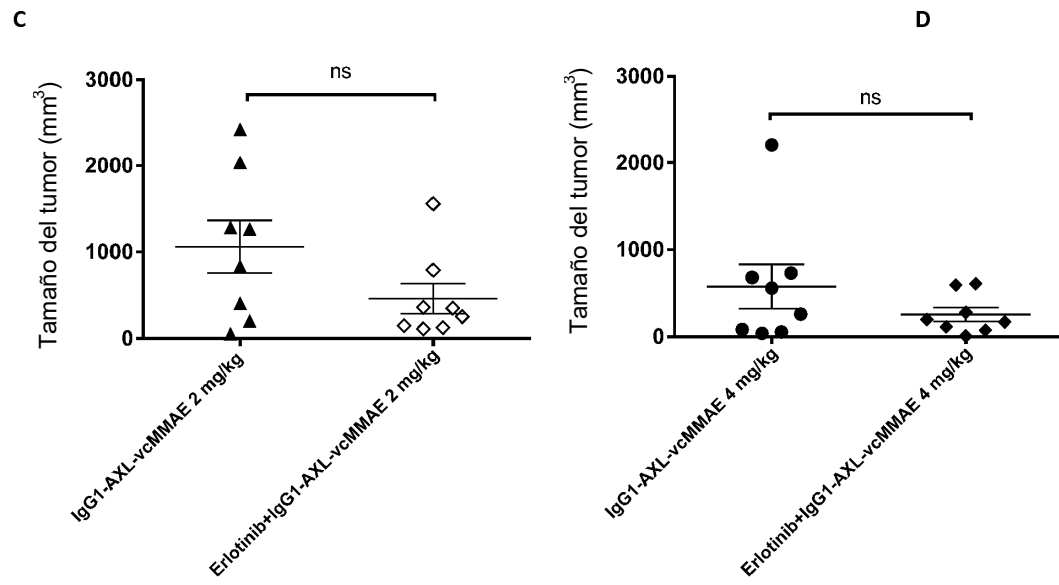
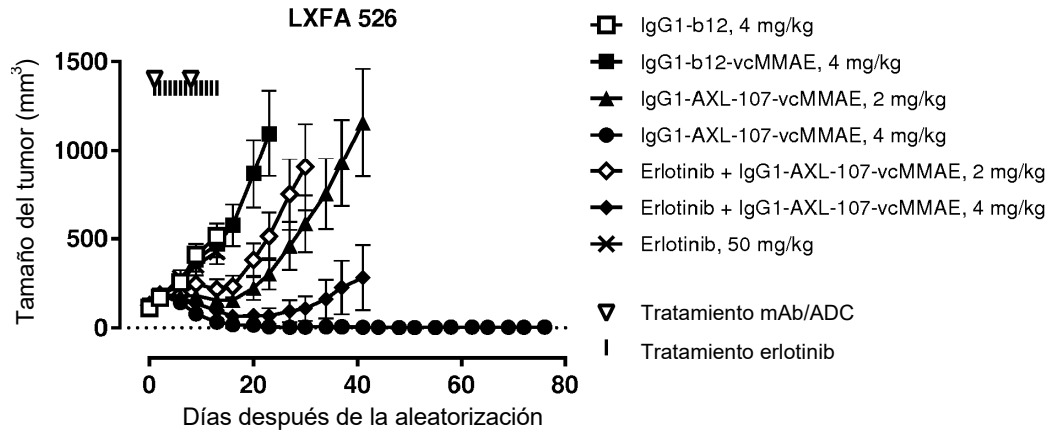


Figura 34

A



B

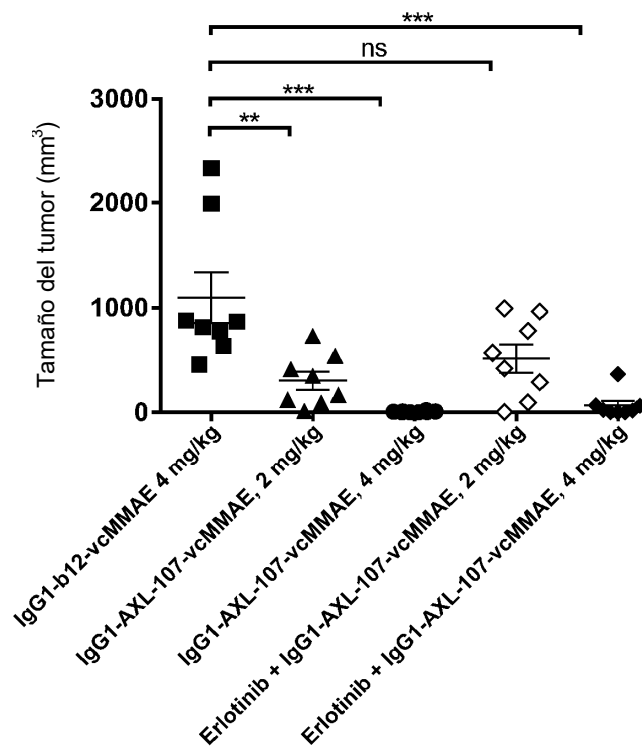
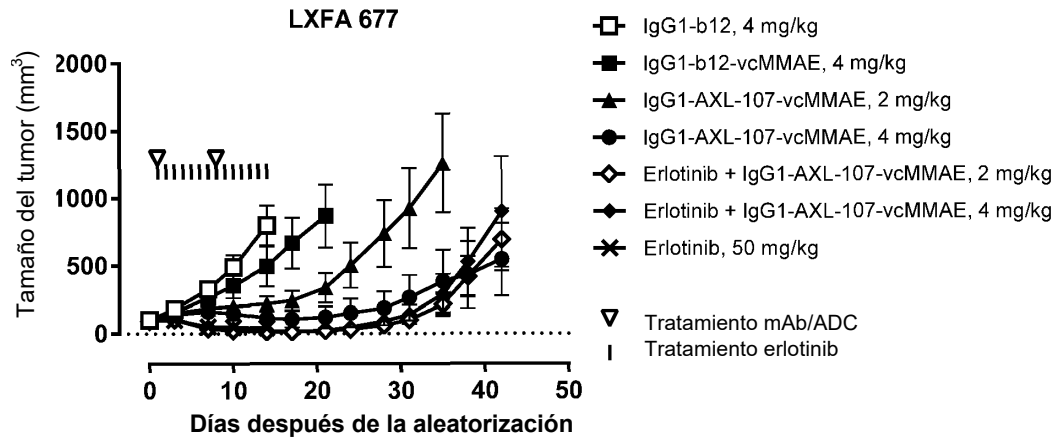


Figura 35

A



B

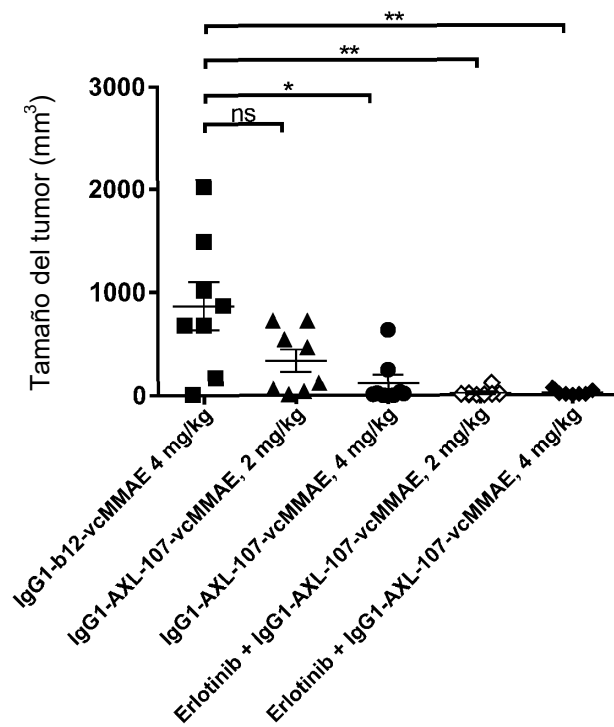
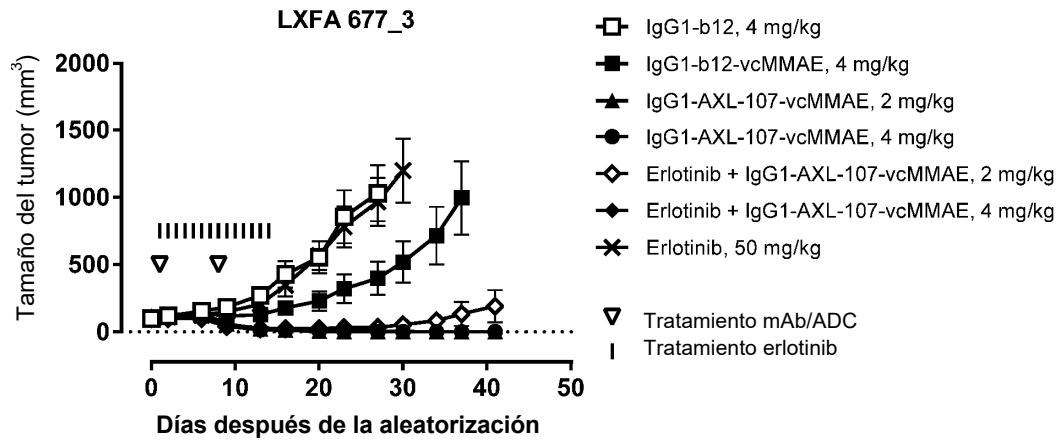


Figura 35 (continuación)

C



D

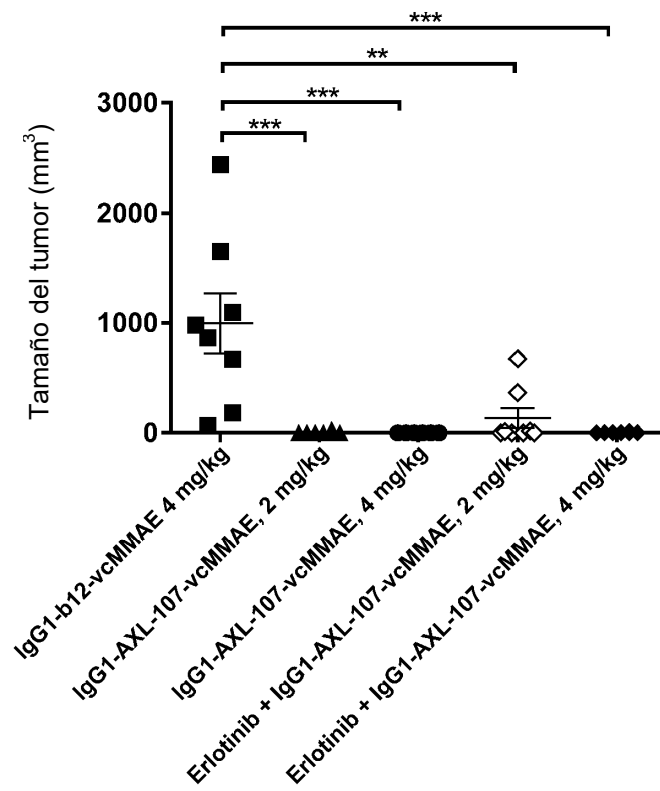
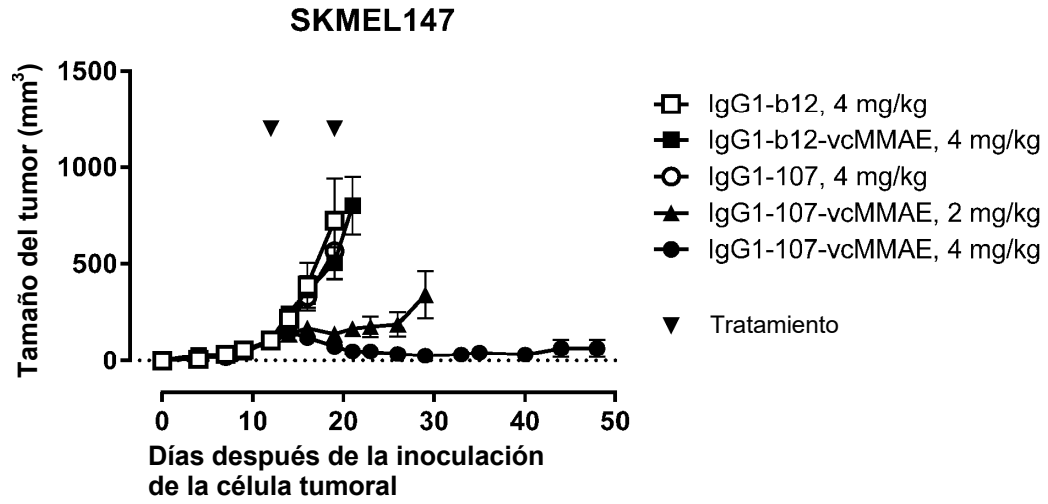


Figura 36

A



B

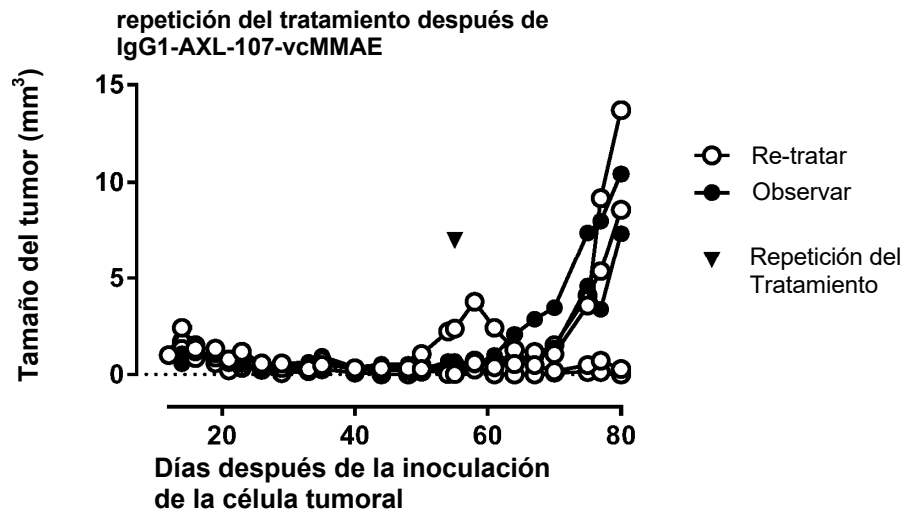
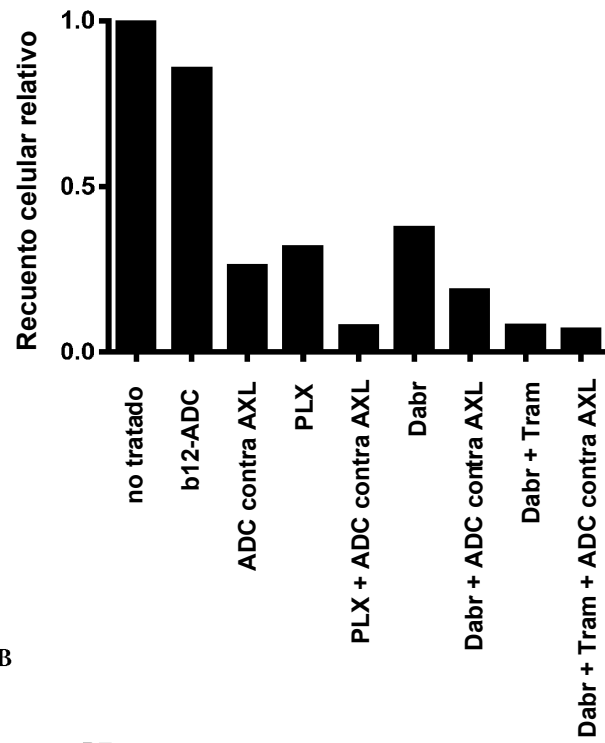


Figura 37

A



B

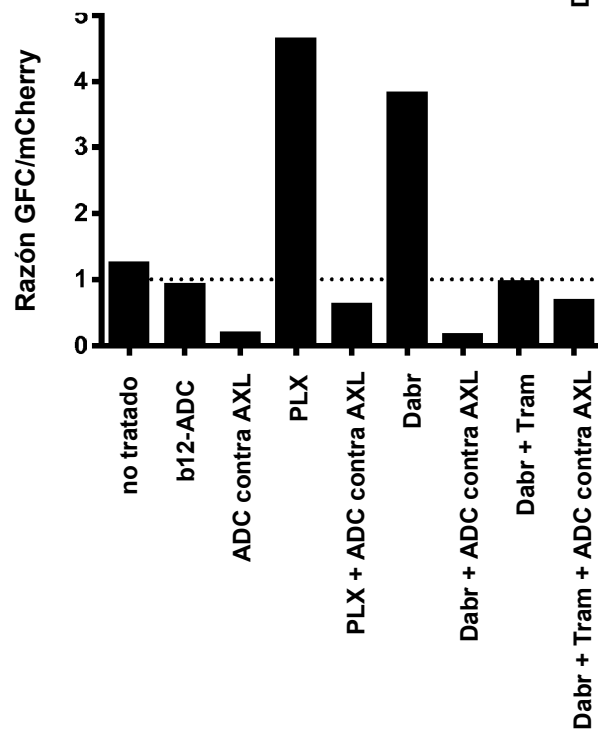
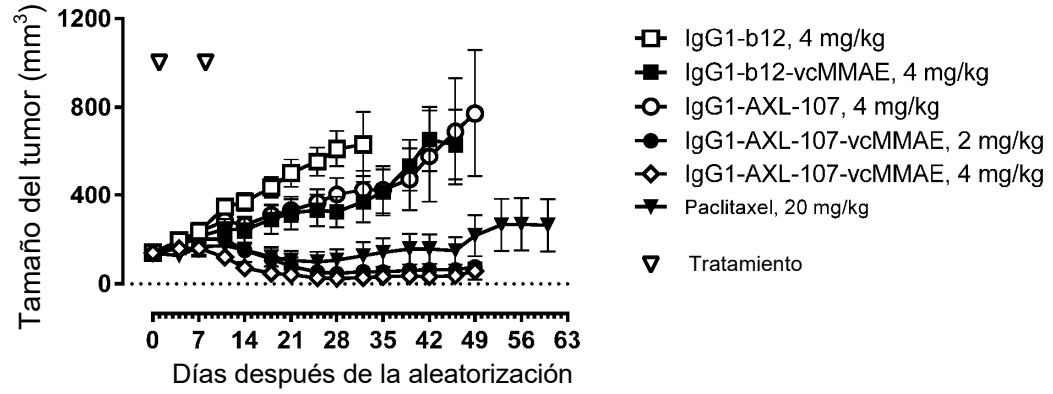


Figura 38

A



B

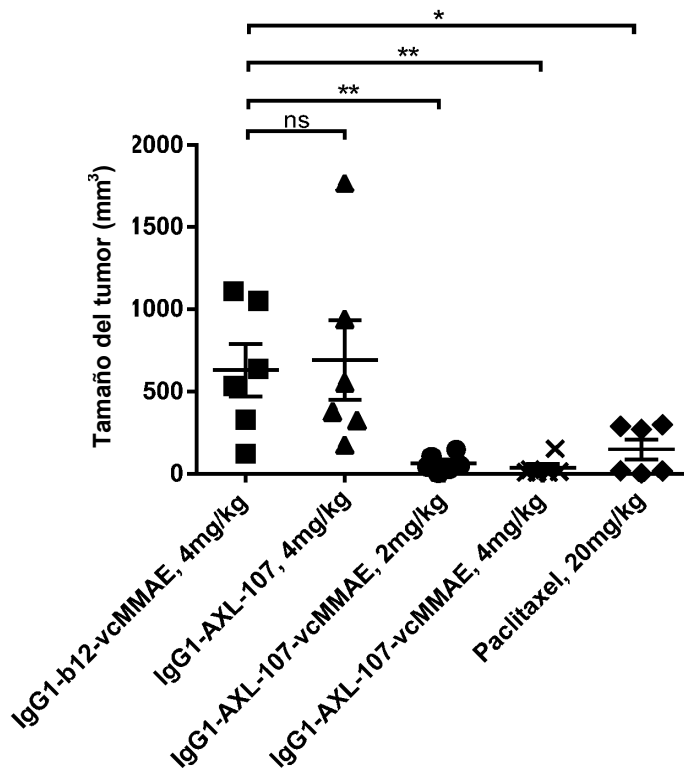
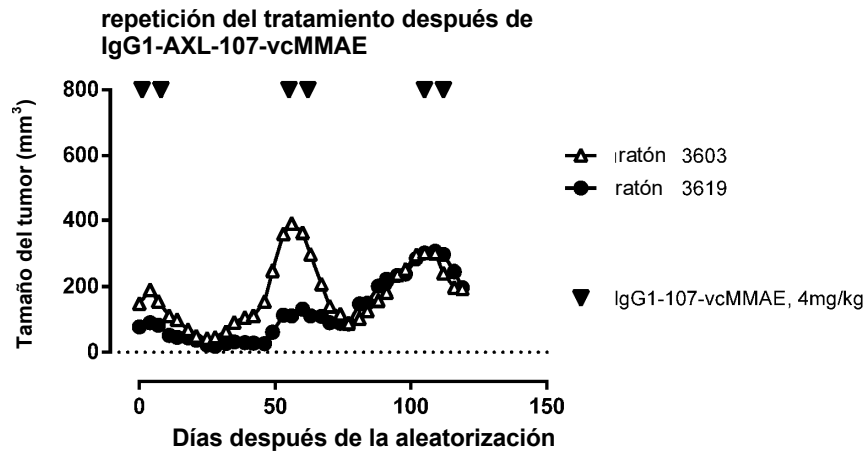


Figura 38 - continuación

C



D

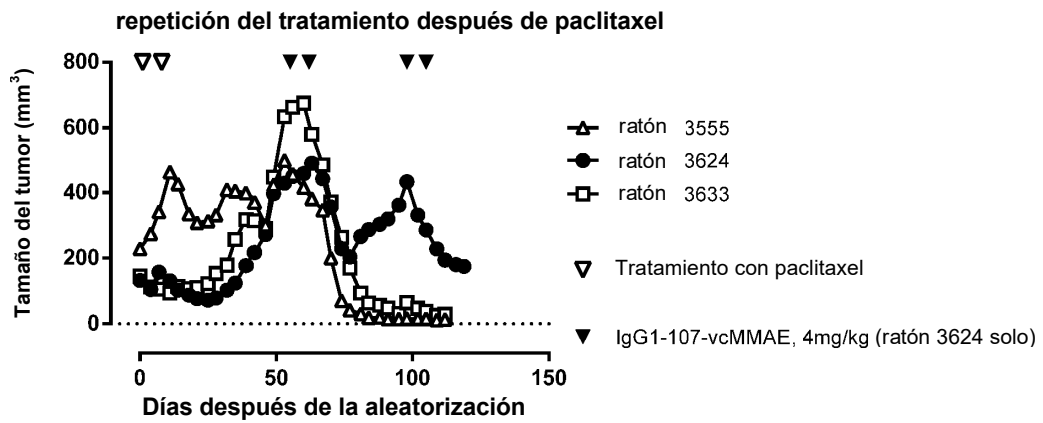
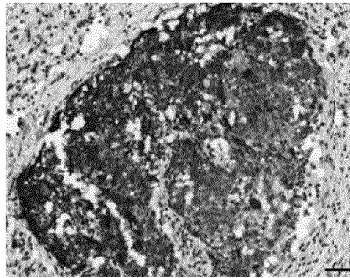
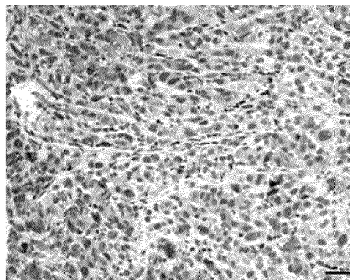


Figura 39

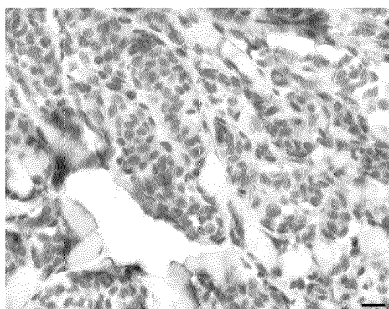
A



B



C



D

