Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

CSA126536

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-68105

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS DE AXL

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** U3 PHARMA GMBH

DOMICILIO MARTINSRIED, ALEMANIA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

T.V.C.
12-06-2011

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-068105- -00000-0000
Fecha: 2010-06-04 17:20:25 Dep: 2020 DIR NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 376 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 364

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **U3 PHARMA GMBH**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Fraunhoferstr 22,
82152 Martinsried,
Alemania

Domicilio: 82152 Martinsried,
Alemania

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Thore HETTMANN**
Am Stadtpark 38d,
81243 München,
Alemania

2. **Jens NIEWÖHNER**
Schuchstr. 15,
81477 München,
Alemania

3. **Jens RUHE**
Keplerweg 8,
82152 Martinsried,
Alemania

4. **Peter WIRTZ**
Buchendorfer Strasse 24,
82131 Gauting,
Alemania

5. **Kerstin SELLE**
Föhrengrund 6,
82349 Pentenried,
Alemania

6. **Esther ZWICK-WALLASCH**
Frühlingsstrasse 112,
82131 Gauting,
Alemania

7. **Mike ROTHE**
Elisenstrasse 4,
82152 Krailling,
Alemania

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/009548 Fecha: 12 de noviembre de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/062690 A1 Fecha: 22 de mayo de 2009

6 Título (54)

ANTICUERPOS DE AXL (Fbls 364)

7 Clasificación Internacional (51) C07K 016/028

8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP	12 de noviembre de 2007	07021931.6

9

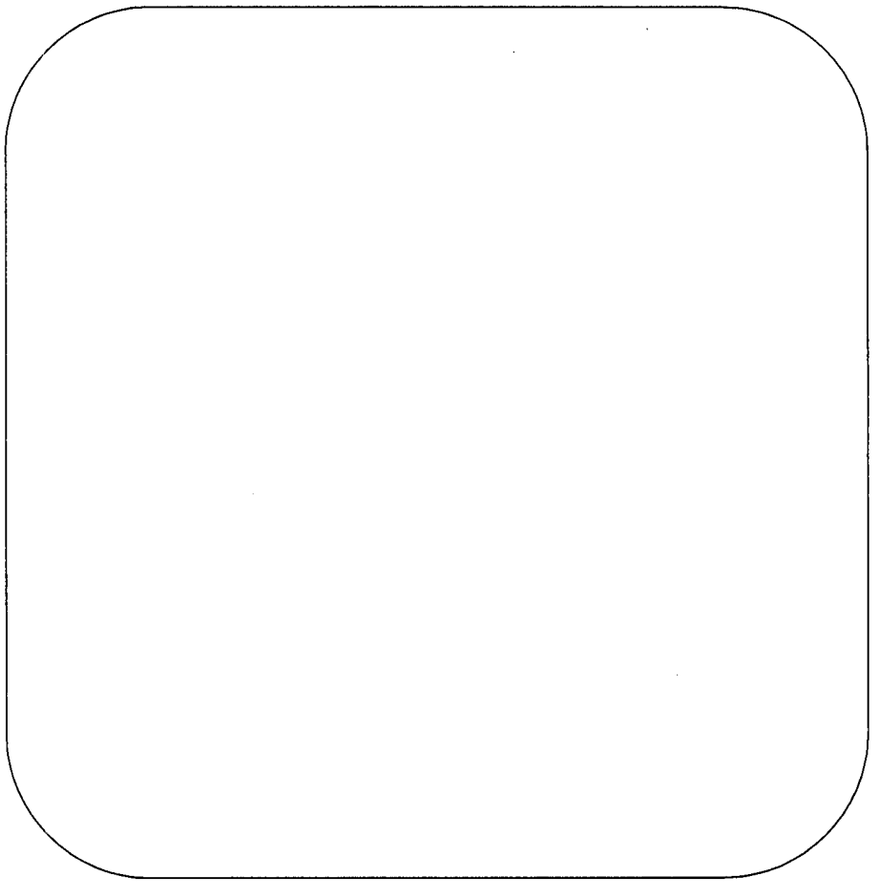
Comprobante de pago No.: 10-32,517 **Fecha:** 26 de abril de 2010
Comprobante de pago No.: 10-37-624 **Fecha:** 10 de mayo de 2010
Comprobante de pago No.: 10-40,466 **Fecha:** 19 de mayo de 2010

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 39 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $1.014.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA**



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Páez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. [X] Publicación Internacional WO 2009/062690 A1

   Descripción:

   Páginas 90 en el idioma original

   Páginas 120 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 49

   Figuras: Número (s) 20

2. [X] **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. [X] Listado de Secuencias.

4. [X] **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de nombre del solicitante **U3 PHARMA AG** por **U3 PHARMA GMBH.**

5. [X] **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de dirección del solicitante **U3 PHARMA GMBH.**

6. [X] Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

Notaría Sexta (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 4

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1098
FECHA: 01/Marzo/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER GENERAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
NIDIA OSORIO LOPEZ

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co

6

ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - --1098 - — - - - -

- - - - - - -MIL NOVENTA Y OCHO - - - - - - -

DE FECHA: MARZO PRIMERO (1) - - - - - - - - - -

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010) - - - - — - - -

OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6a) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. ----------

CLASE DE ACTO O CONTRATO: **PODER ESPECIAL** ----------

DE: **CAVELIER ABOGADOS** ----------

A : **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, NIDIA OSORIO LÓPEZ, OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA, EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY y JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL** ----------

En la ciudad de Bogotá D.C. República de Colombia, ante mí, AMPARO QUINTERO ARTURO ——— Notaria sexta (6a.) ——— de éste círculo notarial, se otorgó la presente escritura pública que se consigna en los siguientes términos: ----------

COMPARECENCIA: Con minuta escrita, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo:----------

ESTIPULACIONES: ----------

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la **Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.** ----------

SEGUNDA: Que **U3 PHARMA GMBH** ——————— ., sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania, domiciliada en Fraunhoferstr 22 82152 Martinsried, Alemania, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. ----------

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **U3 PHARMA GMBH** ——————— , confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ,** T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA**

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

IMPRESO EN DICIEMBRE 1° DE 2009 POR POLYPRINT EDITORIAL LTDA. - NIT 830027959-5

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

BARBOSA, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: ----------

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos ----------

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso- administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. ----------

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. ----------

QUINTO- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS,** igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día 22 de Diciembre de 2009 - - - por **U3 PHARMA GMBH** , ———————— documento que está debidamente

7

62

S3546

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 – COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

U3 PHARMA GMBH

domiciliado (s) cn/of FRAUNHOFERSTR. 22 82152 MARTINSRIED / GERMANY

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar,

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the

© CAVELIER ABOGADOS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
ARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ

admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 22.12.2009

En/in _____

Por/by _____

Firma/Signature

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada*.

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized*.

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

URNr. S3546 /2009

I hereby certify that the above are the true signatures, subscribed in my presence, of

1. Mr. Dr. Johannes Albrecht Bange, of Fraunhoferstr. 22, 82152 Planegg OT Martinsried,
   born at 06.02.1969,
   personally known,
2. Mr. Dr. Koichi Akahane, of Fraunhoferstr. 22, 82152 Planegg OT Martinsried,
   born at 12.05.1955,
   personally known,

acting on behalf of "U3 Pharma GmbH" a private limited company having its principal place of business in Planegg OT Martinsried/Munich, Germany.

From inspection of the Commercial Register of the District Court of Munich on the 22nd of November 2009, I hereby certify that the said firm "U3 Pharma GmbH ", having is principal place of business in Planegg OT Martinsried/Munich, is entered in Section B of the said Register under No 177122, and Mr. Dr. Johannes Albrecht Bange as managing director and Mr. Dr. Koichi Akahane as managing director are jointly authorized to represent it.

Munich, 22nd of Dezember 2009

Schmitt, Notary

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

   Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notar **Bernd Schmitt**

3. in seiner Eigenschaft als **Notar**

4. Sie ist versehen mit dem Siegel des **Notars Bernd Schmitt in München**

Bestätigt

5. in München
6. am 21. Januar 2010
7. durch den Präsidenten des Landgerichts München I
8. unter Nr. 910a-436/2010
9. Siegel
10. Unterschrift
    In Vertretung:

Thomas Spielbauer
Vizepräsident

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

- 1 MAR. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 02.24/10f realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **U3 PHARMA GMBH**, domiciliada en FRAUNHOFERSTR. 22 82152 MARTINSRIED, ALEMANIA, nombra a **CAVELIER ABOGADOS**, una sociedad colectiva debidamente constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, con Matrícula Mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, de Bogotá, Colombia, como su representante en todos los asuntos de Propiedad Intelectual.

Dado y firmado el 22 de diciembre de 2009.

Firma *Firma Ilegible* *Firma Ilegible*

URNr. S3546/2009

Por el presente certifico que las anteriores son las firmas auténticas, suscritas en mí presencia, de

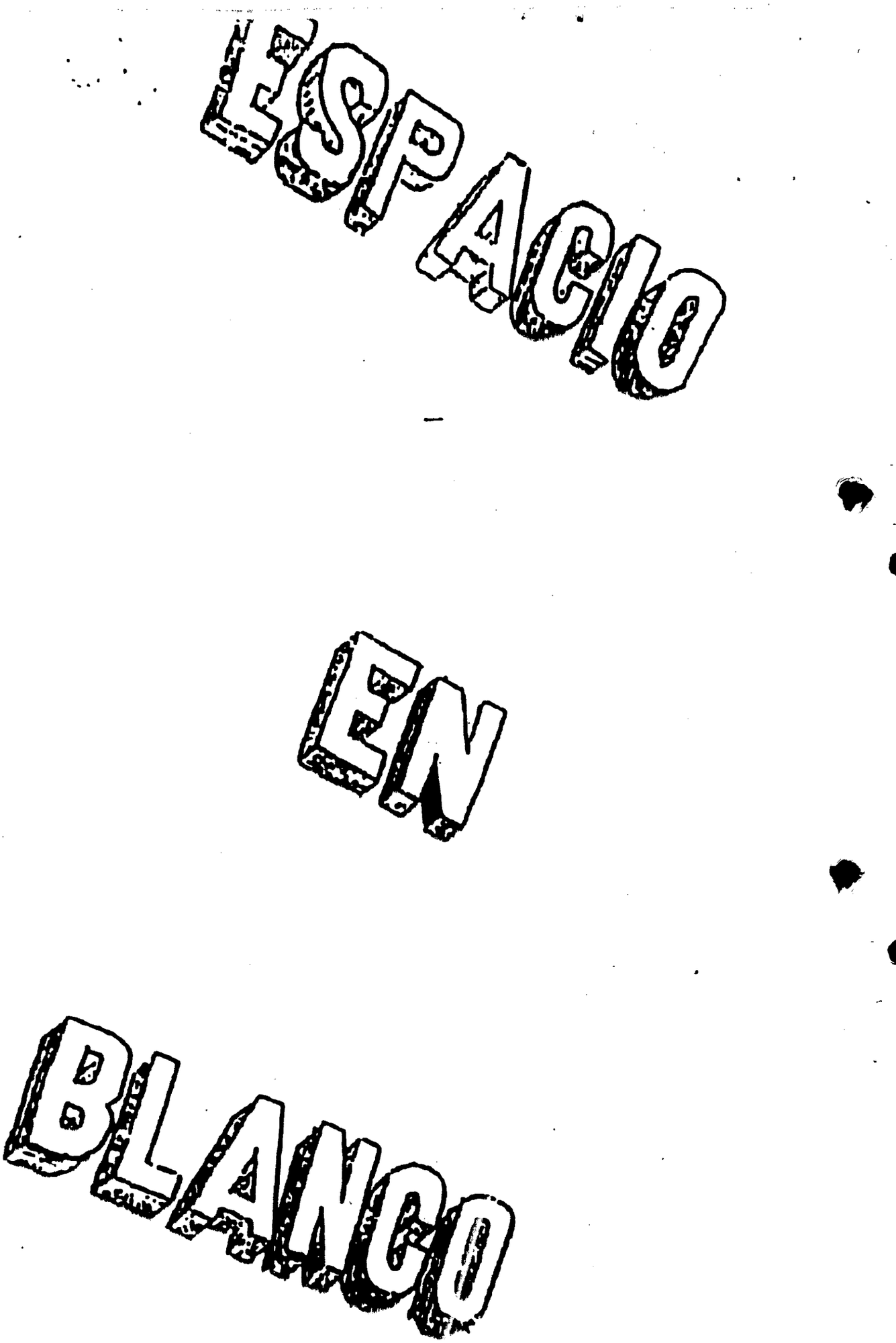
1. El Sr. Dr. Johannes Albrecht Bange, domiciliado en Fraunhoferstr. 22, 82152 Planegg OT Martinsried,
   nacido el 06.12.1969,
   a quien conozco personalmente
2. El Sr. Dr. Koichi Akahane, domiciliado en Fraunhoferstr. 22, 82152 Planegg OT Martinsried,
   nacido el 12.05.1955,
   a quien conozco personalmente

quienes actúan a nombre de "U3 Pharma GmbH" una compañía limitada privada domiciliada en Planegg OT Martinsried/Munich, Alemania.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMADO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ


ESPACIO
EN
BLANCO

De la revisión del Registro Mercantil del Tribunal de Distrito de Munich el 22 de noviembre de 2009, por el presente certifico que dicha firma "U3 Pharma GmbH", domicilada en Planegg OT Martinsried/Munich, Alemania, se encuentra inscrita en la Sección B de dicho Registro con el No. 177122 y que el señor Dr. Johannes Albrecht Bange, como director ejecutivo y el señor Dr. Koichi Akahane como director ejecutivo están autorizados para representarla conjuntamente.

Munich, 22 de diciembre de 2009

Firma Ilegible

Schmitt, Notario

Sello de Apostille expedido en la República Federal de Alemania y certificado en Munich el 21 de enero de 2010 con el **Nr. 910 a-436/2010**, firmado por Thomas Spielbauer.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.
DVZ\DVZ\ID-166371\WPCL002H\COLO 17559-845-001-3

TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1994
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMILCAR QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

La presente traducción oficial No. 0018'10 fue elaborada por Hernando Torres Barrera, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución 01305 de 1998 del Ministerio de Justicia y del Derecho.

A continuación se traduce una apostilla en alemán, que acompaña a la Certificación Notarial No. 53546 / 2009 en idioma inglés en un DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN.

APOSTILLA

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento público
2. está firmado por el Notario **Bernd Schmitt**

3. en su calidad de **Notario**

4. lleva el sello del **Notario**
Bernd Schmitt en Munich

Certificado

5. en Munich 6. el 21 de enero de 2010

7. por el Presidente del Tribunal Regional de Munich I

8. bajo el No. 910a - 436/2010

9. Sello/timbre 10. Firma
En representación:

Thomas Spielbauer
Vicepresidente

SELLO: EL PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL MUNICH I * BAVIERA *

Bogotá, D.C., 24 de febrero de 2010

HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

* *

****
* EN JUNIO DE ESTE AÑO SE ELEGIRAN JUNTA DIRECTIVA Y REVISOR FISCAL *
* DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA. LAS INSCRIPCIONES DE *
* CANDIDATOS DEBEN HACERSE EN LA PRIMERA QUINCENA DE MAYO. *
* PARA INFORMACION DETALLADA DIRIGIRSE A LA SEDE PRINCIPAL, QUINTO *
* PISO, O COMUNICARSE AL SIGUIENTE TELEFONO: 5941000 EXTENSION 2899.*
****

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII,LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337
7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO. 1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO. 1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO. 2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO. 2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO. 3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO. 3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO. 4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO. 4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO. 4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO. 4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO. 4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO. 4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO. 5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO. 5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO. 5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO. 5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO. 6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO. 6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO. 6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

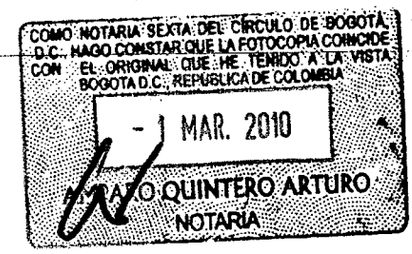
E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO.INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN



INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: $10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE $1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568
NO. CUOTAS: 8,800.00 VALOR: $8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00 VALOR: $1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

CHAVARRO JORGE C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
TOTALES
NO. CUOTAS: 10,000.00 VALOR: $10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
ARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)

GALLON GIRALDO CARLOS C.C. 000000019066425

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

CAVELIER GAVIRIA GERMAN C.C. 000000002877924

SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

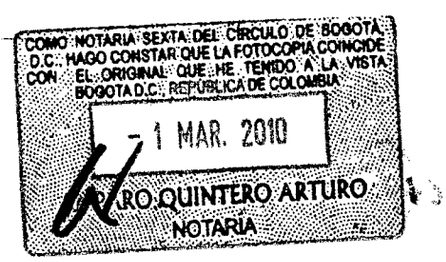
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE



75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : $ 3,600
DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 1 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

7 700004 342146

legalizado ----------

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública ----------

---------- **HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA** ----------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION: LEIDA la presente escritura por los comparecientes y habiéndoseles hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartieron su aprobación y para constancia la firman ante mí el NOTARIO QUE AUTORIZA ----------

DERECHOS NOTARIALES: $ 42.860.oo -- - - - - - - - - - - -

IVA 16% $ 17.365.oo - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

PAPEL NOTARIAL: esta escritura ha quedado extendida en las hojas de papel sellado notarial números: ----------

7-700004-342153 - 7-700004-342146 - - - - - - - - - - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO

OTORGANTE

CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

C.C. 19066424 Bta

TEL 3373611

REPRESENTANTE LEGAL DE **CAVELIER ABOGADOS**

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTA D.C.

T1159/10.FG.ANGELIK

NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

IMPRESO EN DICIEMBRE 1° DE 2009 POR COLVERNIT EDITORIAL LTDA. - NIT 830.026.950-5

ES FIEL Y CUARTA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1098 DE FECHA 01 DE MARZO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 10 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 01DE JUNIO DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D. C.

REPUBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Ruiz
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

AMP[illegible] ARTURO
NOTA[illegible] BOGOTA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-068105- -00000-0000
Fecha: 2010-06-04 17:20:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASOR
Tra: 11 PATENTEnll Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 364

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 May 2009 (22.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/062690 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/282* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/009548

(22) International Filing Date:
12 November 2008 (12.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07021931.6 12 November 2007 (12.11.2007) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **U3 PHARMA GMBH** [DE/DE]; Bunsenstrasse 1, 82152 Martinsried (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HETTMANN, Thore** [DE/DE]; Am Stadtpark 38d, 81243 München (DE). **NIEWÖHNER, Jens** [DE/DE]; Schuchstr. 15, 81477 München (DE). **RUHE, Jens** [DE/DE]; Keplerweg 8, 82152 Martinsried (DE). **WIRTZ, Peter** [DE/DE]; Buchendorfer Str. 24, 82131 Gauting (DE). **SELLE, Kerstin** [DE/DE]; Föhrengrund 6, 82349 Pentenried (DE). **ZWICK-WALLASCH, Esther** [DE/DE]; Frühlingestrasse 112, 82131 Gauting (DE). **ROTHE, Mike** [DE/DE]; Elisenstrasse 4, 82152 Krailling (DE).

(74) Agents: **WEICKMANN & WEICKMANN** et al.; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(54) Title: AXL ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention refers to antibodies, particularly to monoclonal antibodies, which bind to the extracellular domain of the AXL receptor tyrosine kinase and which at least partially inhibit AXL activity.

WO 2009/062690 A1

AXL antibodies

Description

The present invention refers to antibodies, particularly to monoclonal antibodies, which bind to the extracellular domain of the AXL receptor tyrosine kinase and which at least partially inhibit AXL activity.

Background

The AXL (Ark, UFO, Tyro-7) receptor tyrosine kinase is a member of the Tyro-3 family of kinases with the other members being Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12) and Sky (Rse, Tyro-3, Dtk, Etk, Brt, Tif). It is activated by binding of the heterophilic ligand Gas6, a 70-kDa protein homologous to the anti-coagulation factor protein S. In contrast to other receptor tyrosine kinases, AXL tyrosine phosphorylation can also be induced by homophilic binding. AXL activation leads to signalling through PI-3-kinase/Akt (Franke et al., Oncogene 22: 8983-8998, 2003) and other major pathways like Ras/Erk and β-catenin/TCF (Goruppi et al., Mol. Cell Biol. 21: 902-915, 2001).

AXL is weakly expressed in a range of normal tissues, including brain, heart, skeletal muscle, the organ capsules and connective tissues of several other organs, and in monocytes, but not lymphocytes. Akt phosphorylation induced by AXL has been described in survival of fibroblasts (Goruppi et al., Mol Cell Biol 17: 4442-4453 1997), endothelial cells (Hasanbasic et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004), vascular smooth muscle cells (Melaragno et al., J. Mol. Cell Cardiol. 37: 881-887, 2004) and neurons (Allen et al., Mol. Endocrinol. 13: 191-201 1999). Furthermore, AXL plays a role in cell-adhesion and chemotaxis. AXL knockouts display impaired platelet aggregate stabilization and thrombus formation as a result of reduced activation of the platelet integrin IIb3.

AXL overexpression has been demonstrated in various cancer types, e.g.

breast (Meric et al., Clin. Cancer Res. 8: 361-367, 2002; Berclaz et al., Ann. Oncol. 12: 819-824, 2001), colon (Chen et al., Int. J. Cancer 83: 579-584, 1999; Craven et al., Int. J. Cancer 60: 791-797, 1995), prostate (Jacob et al., Cancer Detect. Prev. 23: 325-332, 1999), lung (Wimmel et al., Eur J Cancer 37: 2264-2274, 2001), gastric (Wu et al., Anticancer Res 22: 1071-1078, 2002), ovarian (Sun et al., Oncology 66: 450-457, 2004), endometrial (Sun et al., Ann. Oncol. 14: 898-906, 2003), renal (Chung et al., DNA Cell Biol. 22: 533-540, 2003), hepatocellular (Tsou et al., Genomics 50:331-340, 1998), thyroid (Ito et al., Thyroid 12:971-975, 2002; Ito et al., Thyroid 9: 563-567, 1999), and esophageal carcinoma (Nemoto et al., 1997), furthermore in CML (Janssen et al., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. Oncogene, 6: 2113-2120, 1991; Braunger et al., Oncogene 14:2619-2631 1997; O'Bryan et al., Mol Cell Biol 11:5016-5031,1991), AML (Rochlitz et al., Leukemia 13: 1352-1358, 1999), osteosarcoma (Nakano et al., J. Biol. Chem. 270:5702-5705, 2003) melanoma (van Ginkel et al.,. Cancer Res 64:128-134, 2004) and in head and neck squamous cell carcinoma (Green et al., Br J Cancer. 2006 94:1446-5, 2006).

Moreover AXL has been identified as a metastasis-associated gene that is upregulated in aggressive breast cancer cell lines compared to non-invasive cells. In vitro, AXL activity was found to be required for migration and invasion, and this activity could be inhibited by antibody treatment (WO04008147). Similarly, abrogation of AXL activity in vivo, either via expression of a dominant negative version of AXL (Vajkoczy, P., et al., Proc. Natl. Acad. Science U.S.A. 103: 5799-5804. 2005) or by siRNA mediated downregulation of AXL (Holland et al., Cancer Res. 65: 9294-9303, 2005) prevented subcutaneous and orthotopic cell growth in murine xenograft experiments.

So far two antibodies that bind to AXL and posses biological activity have been described. One antibody is capable of reducing AXL mediated cell invasion (WO04008147) whereas the other antibody has been reported to reduce AXL/Ligand interaction. However both antibodies are polyclonal

rendering them unsuitable for therapeutic administration.

Thus in light of the therapeutic potential of AXL there is a high need for monoclonal AXL antibodies, antibody fragments or derivatives thereof that effectively and specifically block AXL mediated signal transduction and which are suitable for therapeutic treatment.

Accordingly a first aspect of the present invention relates to a monoclonal antibody including a fragment or derivative thereof that binds to the extracellular domain of AXL, particularly of human AXL, and at least partially inhibits AXL activity.

Preferably the antibody of the present invention further possesses at least one or more of the following properties: the ability to reduce or block AXL-mediated signal transduction, the ability to reduce or block AXL phosphorylation, the ability to reduce or block cell proliferation, the ability to reduce or block angiogenesis, the ability to reduce or block cell migration, the ability to reduce or block tumor metastasis, the ability to reduce or block AXL mediated PI3K signaling and the ability to reduce or block AXL mediated anti-apoptosis, thereby increasing for example the sensitivity of a cell against treatment with an antineoplastic agent. Moreover the antibodies of the present invention may exhibit high specificity for AXL, particularly human AXL and do not significantly recognize other Tyro-3 family members, e.g. MER and/or SKY and/or mammalian non-primate AXL, such as murine AXL. Antibody specificity may be determined by measurements of cross-reactivity as described in the Examples.

The term "activity" refers to the biological function of AXL, which influences the phenotype of a cell, in particular but not limited to cancer phenotypes such as evasion of apoptosis, self sufficiency in growth signals, cell proliferation, tissue invasion and/or metastasis, insensitivity to anti-growth signals (anti-apoptosis) and/or sustained angiogenesis.

The term "AXL mediated signal transduction" means the activation of second messenger pathways triggered by direct or indirect interaction of AXL with second messenger molecules.

The term "AXL phosphorylation" refers to the phosphorylation of amino acid residues, preferably tyrosine residues, either by a second AXL protein (transphosphorylation) or by another protein having protein kinase activity.

The term "cell proliferation" refers to all AXL-involving processes underlying the reproduction of human cells, in particular but not limited to human cancer cells. They contribute to or result in the replication of cellular DNA, separation of the duplicated DNA into two equally sized groups of chromosomes, and the physical division (called cytokinesis) of entire cells, and shall be stimulated or mediated by non-catalytic or catalytic activities of AXL, preferably including AXL phosphorylation and/or AXL-mediated signal transduction.

The term "angiogenesis" refers to all AXL-involving processes that contribute to the growth of new blood vessels from pre-existing vessels, in particular but not limited to new tumor supplying blood vessels. These processes include multiple cellular events such as proliferation, survival, migration and sprouting of vascular endothelial cells, attraction and migration of pericytes as well as basal membrane formation for vessel stabilization, vessel perfusion, or secretion of angiogenic factors by stromal or neoplastic cells, and shall be stimulated or mediated by non-catalytic or catalytic activities of AXL, preferably including AXL phosphorylation and/or AXL-mediated signal transduction.

The term "metastasis" refers to all AXL-involving processes that support cancer cells to disperse from a primary tumor, penetrate into lymphatic and/or blood vessels, circulate through the bloodstream, and grow in a distant focus (metastasis) in normal tissues elsewhere in the body. In particular, it refers to cellular events of tumor cells such as proliferation,

migration, anchorage independence, evasion of apoptosis, or secretion of angiogenic factors, that underly metastasis and are stimulated or mediated by non-catalytic or catalytic activities of AXL, preferably including AXL phosphorylation and/or AXL-mediated signal transduction.

The term "AXL mediated anti-apoptosis" refers to all AXL-involving processes that prevent human cells, preferably but not limited to human cancer cells from programmed cell death (apoptosis). In particular, it refers to processes that prevent human cells, preferably but not limited to human cancer cells from induction of apoptosis through growth factor withdrawal, hypoxia, exposure to chemotherapeutic agents or radiation, or initiation of the Fas/Apo-1 receptor-mediated signaling, and are stimulated or mediated by non-catalytic or catalytic activities of AXL, preferably including AXL phosphorylation and/or AXL-mediated signal transduction.

In addition, the present invention includes antibodies whose binding activities to AXL are KD = 10^{-5} M or lower, preferably KD = 10^{-7} M or lower, and most preferably KD = 10^{-9} M or lower. Whether the binding activity of an antibody of the present invention to AXL is KD = 10^{-5} M or lower can be determined by methods known to those skilled in the art. For example, the activity can be determined using surface plasmon resonance with Biacore, and/or by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), EIA (enzyme immunoassays), RIA (radioimmunoassays), or fluorescent antibody techniques, e.g. FACS.

In a second aspect, the antibody may have at least one antigen binding site, e.g. one or two antigen binding sites. Further, the antibody preferably comprises at least one heavy immunoglobulin chain and at least one light immunoglobulin chain. An immunoglobulin chain comprises a variable domain and optionally a constant domain. A variable domain may comprise complementary determining regions (CDRs), e.g. a CDR1, CDR2 and/or CDR3 region, and framework regions. The term "complementary determining region" (CDR) is well-defined in the art (see, for example, Harlow and Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold

Spring Harbour, 1988) and refers to the stretches of amino acids within the variable region of an antibody that primarily makes contact with the antigen.

A further aspect of the present invention relates to an antibody including a fragment or derivative thereof that binds to the extracellular domain of AXL which comprises at least one heavy chain amino acid sequence comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NOs: 16, 22, 28, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NOs: 17, 23, 29, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and
(c) a CDRH3 as shown in SEQ ID NOs: 18, 24, 30, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or at least:
one light chain amino acid sequence comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ ID NOs: 13, 19, 25, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(e) a CDRL2 as shown in SEQ ID NOs: 14, 20, 26, or a CDRL2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and
(f) a CDRL3 as shown in SEQ ID NOs: 15, 21, 27, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

or a monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

In a preferred embodiment, the antibody comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 16, or a CDRH1 sequence

differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 17, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and

(c) a CDRH3 as shown in SEQ 1D NO: 18, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ 1D NO: 13, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(e) a CDRL2 as shown in SEQ 1D NO: 14, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and

(f) a CDRL3 as shown in SEQ 1D NO: 15, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

In a further preferred embodiment, the antibody comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 22, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 23, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and

(c) a CDRH3 as shown in SEQ 1D NO: 24, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ 1D NO: 19, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(e) a CDRL2 as shown in SEQ 1D NO: 20, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and

(f) a CDRL3 as shown in SEQ 1D NO: 21, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

In a yet further preferred embodiment, the antibody comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 28, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 29, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and
(c) a CDRH3 as shown in SEQ 1D NO: 30, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of
(d) a CDRL1 as shown in SEQ 1D NO: 25, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(e) a CDRL2 as shown in SEQ 1D NO: 26, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and
(f) a CDRL3 as shown in SEQ 1D NO: 27, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

In another embodiment, the present invention refers to an antibody comprising a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 10, 12 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ. ID NOs: 7, 9, 11 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto or to an antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

As used herein, "sequence identity" between two polypeptide sequences, indicates the percentage of amino acids that are identical between the sequences. Preferred polypeptide sequences of the invention have a sequence identity of at least 90%.

In a particular preferred embodiment, the antibody is selected from the group consisting of 11B7, 11D5, 10D12 or an antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

The antibody may be any antibody of natural and/or synthetic origin, e.g. an antibody of mammalian origin. Preferably, the constant domain -if present- is a human constant domain. The variable domain is preferably a mammalian variable domain, e.g. a humanized or a human variable domain. More preferably, the antibody is a chimeric, humanized or human antibody.

The antibody of the invention may be of the IgA-, IgD-, IgE, IgG-or IgM-type, preferably of the IgG-or IgM-type including, but not limited to, the IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-, IgM1-and IgM2-type. In most preferred embodiments, the antibody is of the human IgG1-, IgG2-or IgG4-type.

As discussed, supra, there are a number of isotypes of antibodies. It will be appreciated that antibodies that are generated need not initially possess such an isotype but, rather the antibody as generated can possess any isotype and that the antibody can be isotype-switched by using the molecularly cloned V region genes or cloned constant region genes or cDNAs in appropriate expression vectors using conventional molecular biological techniques that are well known in the art and then expressing the antibodies in host cells using techniques known in the art

The term antibody includes "fragments" or "derivatives", which have at least one antigen binding site of the antibody. Antibody fragments include Fab fragments, Fab' fragments $F(ab')_2$ fragments as well as Fv fragments.

Derivatives of the antibody include single chain antibodies, nanobodies, and diabodies. Derivatives of the antibody shall also include scaffold proteins having an antibody-like binding activity that bind to AXL.

Within the context of the present invention, the term "scaffold protein", as used herein, means a polypeptide or protein with exposed surface areas in which amino acid insertions, substitutions or deletions are highly tolerable. Examples of scaffold proteins that can be used in accordance with the present invention are protein A from Staphylococcus aureus, the bilin binding protein from Pieris brassicae or other lipocalins, ankyrin repeat proteins, and human fibronectin (reviewed in Binz and Plückthun, Curr Opin Biotechnol,16: 459-69, 2005). Engineering of a scaffold protein can be regarded as grafting or integrating an affinity function onto or into the structural framework of a stably folded protein. Affinity function means a protein binding affinity according to the present invention. A scaffold can be structurally separable from the amino acid sequences conferring binding specificity. In general, proteins appearing suitable for the development of such artificial affinity reagents may be obtained by rational, or most commonly, combinatorial protein engineering techniques such as panning against AXL, either purified protein or protein displayed on the cell surface, for binding agents in an artificial scaffold library displayed in vitro, skills which are known in the art (Skerra, J. Mol. Recog., Biochim Biophys Acta, 1482: 337-350, 2000; Binz and Plückthun, Curr Opin Biotechnol, 16: 459-69, 2005). In addition, a scaffold protein having an antibody like binding activity can be derived from an acceptor polypeptide containing the scaffold domain, which can be grafted with binding domains of a donor polypeptide to confer the binding specificity of the donor polypeptide onto the scaffold domain containing the acceptor polypeptide. The inserted binding domains may include, for example, at least one CDR of an anti-AXL antibody, preferably at least one selected from the group of SEQ ID NOs: 13-30. Insertion can be accomplished by various methods known to those skilled in the art including, for example, polypeptide synthesis, nucleic acid synthesis of an encoding amino acid as well by various forms of recombinant methods well known to

those skilled in the art.

As has been indicated above, the specificity of the antibody, antibody fragment, or a derivative thereof lies in the amino acid sequence of the CDR. The variable domain (the heavy chain VH and light chain VL) of an antibody preferably comprises three complementary determining regions sometimes called hypervariable regions, flanked by four relatively conserved framework regions or "FRs". Often, the specificity of an antibody is determined or largely determined by a CDR, such as a CDR of the VH chain or a plurality of CDRs. The person skilled in the art will readily appreciate that the variable domain of the antibody, antibody fragment or derivative thereof having the above-described CDRs can be used for the construction of antibodies of further improved specificity and biological function. Insofar, the present invention encompasses antibodies, antibody fragments or derivatives thereof comprising at least one CDR of the above-described variable domains and which advantageously have substantially the same, similar or improved binding properties as the antibody described in the appended examples. Starting from an antibody that comprises at least one CDR as recited in the attached sequence listing and required by the embodiments of the invention, the skilled artisan can combine further CDRs from the originally identified monoclonal antibodies or different antibodies for an enhanced specificity and/or affinity. CDR grafting is well-known in the art and can also be used to fine-tune the specific affinity and other properties of the antibody, fragment or derivative thereof of the invention, as long as the original specificity is retained. It is advantageous that the antibody, fragment or derivative comprises at least two, more preferred at least three, even more preferred at least four or at least five and particularly preferred all six CDRs of the original donor antibody. In further alternatives of the invention, CDRs from different originally identified monoclonal antibodies may be combined in a new antibody entity. In these cases, it is preferred that the three CDRs of the heavy chain originate from the same antibody whereas the three CDRs of the light chain all originate from a different (but all from the same) antibody. The antibodies of the present invention or their corresponding

immunoglobulin chain(s) can be further modified using conventional techniques known in the art, for example, by using amino acid deletion(s), insertion(s), substitution(s), addition(s), and/or recombination(s) and/or any other modification(s) known in the art either alone or in combination. Methods for introducing such modifications in the DNA sequence underlying the amino acid sequence of an immunoglobulin chain are well known to the person skilled in the art; see, e.g., Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

The antibodies, antibody fragments or derivative thereof are optionally deimmunized for therapeutic purposes. A deimmunized antibody is a protein devoid of or reduced for epitopes that can be recognized by T helper lymphozytes. An example how to identify said epitopes is shown in Tangri et al., (J Immunol. 174: 3187-96, 2005). The manufacture of deimmunized antibody fragments or derivative thereof may be carried out as described in U.S. Pat. Nos. 6,054,297, 5,886,152 and 5,877,293.

In one embodiment the antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Pat. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). The production of chimeric antibodies is described, for example, in WO 89/09622.

Preferably, the present invention refers to a chimerized antibody comprising a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 38, 39, 41, 42 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto

and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ. ID NOs: 37, 40 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto or to an antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

In a further embodiment the antibodies of the present invention are humanized or fully human antibodies. Humanized forms of the antibodies may be generated according to the methods known in the art such as chimerization or CDR grafting. Alternative methods for the production of humanized antibodies are well known in the art and are described in, e.g., EP-A1 0 239 400 and W090/07861. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be for example performed following the method of Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), by substituting CDRs or CDR sequences of non human origin for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Pat. No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in non human antibodies.

Preferably, the present invention refers to a humanized antibody comprising a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 44, 46 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ. ID NOs: 43, 45 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto or to an

antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

One method for generating fully human antibodies is through the use of XenoMouse® strains of mice that have been engineered to contain up to but less than 1000 kb sized germline configured fragments of the human heavy chain locus and kappa light chain locus. See, Mendez et al., , (Nature Genetics 15:146-156 1997), and Green and Jakobovits, ,(J. Exp. Med. 188:483-495, 1998). The XenoMouse® strains are available from AMGEN, Inc. (formerly ABGENIX, Fremont, CA).

The production of the XenoMouse® strains of mice is discussed and delineated in U.S. Patent Application Serial Nos. 07/466,008, filed January 12, 1990, 07/610,515, filed November 8, 1990, 07/919,297, filed July 24, 1992, 07/922,649, filed July 30, 1992, 08/031,801, filed March 15, 1993, 08/112,848, filed August 27, 1993, 08/234,145, filed April 28, 1994, 08/376,279, filed January 20, 1995, 08/430, 938, filed April 27, 1995, 08/464,584, filed June 5, 1995, 08/464,582, filed June 5, 1995, 08/463,191, filed June 5, 1995, 08/462,837, filed June 5, 1995, 08/486,853, filed June 5, 1995, 08/486,857, filed June 5, 1995, 08/486,859, filed June 5, 1995, 08/462,513, filed June 5, 1995, 08/724,752, filed October 2, 1996, 08/759,620, filed December 3, 1996, U.S. Publication 2003/0093820, filed November 30, 2001 and U.S. Patent Nos. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181, and 5,939,598 and Japanese Patent Nos. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, and 3 068 507 B2. See, also European Patent No., EP 0 463 151 B1, grant published June 12, 1996, International Patent Application No., WO9402602, published February 3, 1994, International Patent Application No., WO9634096, published October 31, 1996, WO9824893, published June 11, 1998, WO0076310, published December 21, 2000. The disclosures of each of the above-cited patents, applications, and references are hereby incorporated by reference in their entirety.

In an alternative approach, others, including GenPharm International, Inc., have utilized a "minilocus" approach. In the minilocus approach, an

exogenous Ig locus is mimicked through the inclusion of pieces (individual genes) from the Ig locus. Thus, one or more VH genes, one or more DH genes, one or more JH genes, a mu constant region, and usually a second constant region (preferably a gamma constant region) are formed into a construct for insertion into an animal. This approach is described in U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani et al. and U.S. Patent Nos. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299, and 6,255,458 each to Lonberg and Kay, U.S. Patent No. 5,591,669 and 6,023.010 to Krimpenfort and Berns, U.S. Patent Nos. 5,612,205, 5,721,367, and 5,789,215 to Berns et al., and U.S. Patent No. 5,643,763 to Choi and Dunn, and GenPharm International U.S. Patent Application Serial Nos. 07/574,748, filed August 29, 1990, 07/575,962, filed August 31, 1990, 07/810,279, filed December 17, 1991, 07/853,408, filed March 18, 1992, 07/904,068, filed June 23, 1992, 07/990,860, filed December 16, 1992, 08/053,131, filed April 26, 1993, 08/096,762, filed July 22, 1993, 08/155,301, filed November 18, 1993, 08/161,739, filed December 3, 1993, 08/165,699, filed December 10, 1993, 08/209,741, filed March 9, 1994, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. See, also European Patent No. 0 546 073 B1, International Patent Application Nos. WO9203918, WO9222645, WO9222647, WO9222670, WO9312227, WO9400569, WO9425585, WO9614436, WO9713852, and WO9824884 and U.S. Patent No. 5,981,175, the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

Kirin has also demonstrated the generation of human antibodies from mice in which, through microcell fusion, large pieces of chromosomes, or entire chromosomes, have been introduced. See, European Patent Application Nos. 773 288 and 843 961, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Additionally, KMTM mice, which are the result of cross-breeding of Kirin's Tc mice with Medarex's minilocus (Humab) mice have been generated. These mice possess the human IgH transchromosome of the Kirin mice and the kappa chain transgene of the Genpharm mice (Ishida

et al., , Cloning Stem Cells 4:91-102, 2002).

Human antibodies can also be derived by in vitro methods. Suitable examples include but are not limited to phage display (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (formerly Proliferon), Affimed) ribosome display (CAT), yeast display, and the like.

For therapeutic purposes, the antibody may be conjugated with a therapeutic effector group, e.g. a radioactive group or a cytotoxic group.

For diagnostic purposes, the antibody may be labelled. Suitable labels include radioactive labels, fluorescent labels, or enzyme labels.

Further antibodies to be utilized in accordance with the present invention are so-called xenogenic antibodies. The general principle for the production of xenogenic antibodies such as human antibodies in mice is described in, e.g., WO9110741, WO 9402602, WO 9634096 and WO 9633735.

As discussed above, the antibody of the invention may exist in a variety of forms besides complete antibodies; including, for example, Fv, Fab′ and $F(ab')_2$ as well as in single chains; see e.g. W08809344.

If desired, the antibodies of the invention may be mutated in the variable domains of the heavy and/or light chains to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of the CDR regions to increase or decrease the Kd of the antibody for AXL, or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site directed mutagenesis are well-known in the art. See, e.g., Sambrook et al. and Ausubel et al., supra. Furthermore, mutations may be made at an amino acid residue that is known to be changed compared to germline in a variable region of an AXL antibody. In another aspect, mutations may be introduced into one or more of the framework regions. A mutation may be made in a framework region or constant domain to increase the half-life of the AXL

antibody. See, e.g., WO0009560. A mutation in a framework region or constant domain may also be made to alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation. Mutations may be made in each of the framework regions, the constant domain and the variable regions in a single mutated antibody. Alternatively, mutations may be made in only one of the framework regions, the variable regions or the constant domain in a single mutated antibody.

In a further aspect, the antibody may have a constant domain with effector functions, whereby AXL expressing cells which have bound the antibody, antibody fragment or derivative thereof on the cell surface may be attacked by immune system functions. For example, the antibody may be capable of fixing complement and participating in complement-dependent cytotoxicity (CDC). Moreover, the antibody may be capable of binding to Fc receptors on effector cells, such as monocytes and natural killer (NK) cells, and participate in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

In yet a further aspect the antibodies of the invention are applicable for therapeutic treatment, preferably for treatment of hyperproliferative diseases, cardiovascular diseases, in particular artherosclerosis and thrombosis, diabetes related diseases, in particular glomerular hypertrophy or diabetic nephropathy, and particularly of disorders associated with, accompanied by or caused by AXL expression, overexpression or hyperactivity. The hyperproliferative diseases are preferably selected from disorders associated with, accompanied by or caused by AXL expression, overexpression or hyperactivity, such as cancer, e.g. breast cancer, colon cancer, lung cancer, kidney cancer, follicular lymphoma, myeloid leukemia, skin cancer/melanoma, glioblastoma, ovarian cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, Barrett's esophagus and esophageal cancer, stomach cancer, bladder cancer, cervical cancer, liver cancer, thyroid cancer, and head and neck cancer, or hyperplastic and neoplastic diseases or other AXL expressing or overexpressing hyperproliferative diseases.

In another aspect the antibodies of the present invention can be used for the co-administration with an antineoplastic agent for the treatment of one of the above mentioned disorders.

Co-administration as used herein includes the administration of an antibody of the present invention with an antineoplastic agent, preferably an apoptosis inducing antineoplastic agent. The term co-administration further includes the administration of the antibody of the present invention and the antineoplastic agent, preferably an apoptosis inducing antineoplastic agent, in the form of a single composition or in the form of two or more distinct compositions. Co-administration includes the administration of an antibody of the present invention with an antineoplastic agent, preferably an apoptosis inducing antineoplastic agent simultaneously (i.e. at the same time) or sequentially, (i.e. at intervals).

The invention further relates to a nucleic acid molecule encoding the antibody, antibody fragment or derivative thereof of the invention. The nucleic acid molecule of the invention encoding the above-described antibody, antibody fragment or derivative thereof may be, e.g. DNA, cDNA, RNA or synthetically produced DNA or RNA or recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of those nucleic acid molecules either alone or in combination. The nucleic acid molecule may also be genomic DNA corresponding to the entire gene or a substantial portion thereof or to fragments and derivatives thereof. The nucleotide sequence may correspond to the naturally occurring nucleotide sequence or may contain single or multiple nucleotide substitutions, deletions or additions. In a particular preferred embodiment of the present invention, the nucleic acid molecule is a cDNA molecule.

Preferably, the invention relates to an isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:

(a) a nucleic acid sequence encoding a polypeptide of SEQ ID NOs: 7-12, 13-30, 37-42, 43-46

(b) a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NOs: 1-6, 31-36

(c) a nucleic acid complementary to any of the sequences in (a) or (b); and

(d) a nucleic acid sequence capable of hybridizing to (a), (b) or (c) under stringent conditions.

The term "hybridizing under stringent conditions" means that two nucleic acid fragments hybridize with one another under standardized hybridization conditions as described for example in Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Such conditions are for example hybridization in 6.0xSSC at about 45° C. followed by a washing step with 2.0xSSC at 50° C, preferably 2.0xSSC at 65°C, or 0.2xSSC at 50°C, preferably 0.2xSSC at 65°C.

The invention also relates to a vector comprising a nucleic acid molecule of the invention. Said vector may be, for example, a phage, plasmid, viral or retroviral vector. Retroviral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

The nucleic acid molecules of the invention may be joined to a vector containing selectable markers for propagation in a host. Generally, a plasmid vector is introduced in a precipitate such as a calcium phosphate precipitate or rubidium chloride precipitate, or in a complex with a charged lipid or in carbon-based clusters, such as fullerens. Should the vector be a virus, it may be packaged in vitro using an appropriate packaging cell line prior to application to host cells.

Preferably, the vector of the invention is an expression vector wherein the nucleic acid molecule is operatively linked to one or more control sequences allowing the transcription and optionally expression in prokaryotic and/or

eukaryotic host cells. Expression of said nucleic acid molecule comprises transcription of the nucleic acid molecule, preferably into a translatable mRNA. Regulatory elements ensuring expression in eukaryotic cells, preferably mammalian cells, are well known to those skilled in the art. They usually comprise regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and stabilization of the transcript. Additional regulatory elements may include transcriptional as well as translational enhancers. Possible regulatory elements permitting expression in prokaryotic host cells comprise, e.g., the lac, trp or tac promoter in E. coli, and examples for regulatory elements permitting expression in eukaryotic host cells are the AOXI or GAL1 promoter in yeast or the CMV-, SV40-, RSV-promoter (Rous sarcoma virus), CMV-enhancer, SV40-enhancer or a globin intron in mammalian and other animal cells. Beside elements which are responsible for the initiation of transcription such regulatory elements may also comprise transcription termination signals, such as the SV40-poly-A site or the tk-poly-A site, downstream of the polynucleotide. In this context, suitable expression vectors are known in the art such as Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) or pSPORTI (GIBCO BRL). Preferably, said vector is an expression vector and/ or a gene transfer or targeting vector. Expression vectors derived from viruses such as retroviruses, vaccinia virus, adeno-associated virus, herpes viruses, or bovine papilloma virus, may be used for delivery of the polynucleotides or vector of the invention into targeted cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant viral vectors; see, for example, the techniques described in Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Third Edition) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternatively, the nucleic acid molecules of the invention can be reconstituted into liposomes for delivery to target cells.

The invention further relates to a host comprising the vector of the invention.

Said host may be a prokaryotic or eukaryotic cell or a non-human transgenic animal. The polynucleotide or vector of the invention which is present in the host may either be integrated into the genome of the host or it may be maintained extrachromosomally. In this respect, it is also to be understood that the nucleic acid molecule of the invention can be used for "gene targeting" and/or "gene replacement", for restoring a mutant gene or for creating a mutant gene via homologous recombination; see for example Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press.

The host can be any prokaryotic or eukaryotic cell, such as a bacterial, insect, fungal, plant, animal, mammalian or, preferably, human cell. Preferred fungal cells are, for example, those of the genus Saccharomyces, in particular those of the species S. cerevisiae. The term "prokaryotic" is meant to include all bacteria which can be transformed or transfected with a polynucleotide for the expression of a variant polypeptide of the invention. Prokaryotic hosts may include gram negative as well as gram positive bacteria such as, for example, E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens and Bacillus subtilis. A polynucleotide coding for a mutant form of variant polypeptides of the invention can be used to transform or transfect the host using any of the techniques commonly known to those of ordinary skill in the art. Methods for preparing fused, operably linked genes and expressing them in bacteria or animal cells are well-known in the art (Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Third Edition). The genetic constructs and methods described therein can be utilized for expression of variant antibodies, antibody fragments or derivatives thereof of the invention in, e.g., prokaryotic hosts. In general, expression vectors containing promoter sequences which facilitate the efficient transcription of the inserted nucleic acid molecule are used in connection with the host. The expression vector typically contains an origin of replication, a promoter, and a terminator, as well as specific genes which are capable of providing phenotypic selection of the transformed cells. The transformed prokaryotic hosts can be grown in fermentors and cultured

according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. The antibodies, antibody fragments or derivatives thereof of the invention can then be isolated from the growth medium, cellular lysates, or cellular membrane fractions. The isolation and purification of the microbially or otherwise expressed antibodies, antibody fragments or derivatives thereof of the invention may be by any conventional means such as, for example, preparative chromatographic separations and immunological separations such as those involving the use of monoclonal or polyclonal antibodies.

In a preferred embodiment of the invention, the host is a bacterium, fungal, plant, amphibian or animal cell. Preferred animal cells include but are not limited to Chinese hamster ovary (CHO) cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), 3T3 cells, NSO cells and a number of other cell lines including human cells, for example Per.C6. In another preferred embodiment, said animal cell is an insect cell. Preferred insect cells include but are not limited to cells of the SF9 cell lines

In a more preferred embodiment of the invention, said host is a human cell or human cell line. Said human cells include, but are not limited to Human embryonic kidney cells (HEK293, 293T, 293 freestyle). Furthermore, said human cell lines include, but are not limited to HeLa cells, human hepatocellular carcinoma cells (e. g., Hep G2), A549 cells.

The invention also provides transgenic non-human animals comprising one or more nucleic acid molecules of the invention that may be used to produce antibodies of the invention. Antibodies can be produced in and recovered from tissue or body fluids, such as milk, blood or urine, of goats, cows, horses, pigs, rats, mice, rabbits, hamsters or other mammals. See, e. g., U.S. Patent Nos. 5,827,690; 5,756,687; 5,750,172; and 5,741,957. As described above, non-human transgenic animals that comprise human immunoglobulin loci can be produced by immunizing with AXL or a portion thereof.

The invention additionally relates to a method for the preparation of an antibody, comprising culturing the host of the invention under conditions that allow synthesis of said antibody and recovering said antibody from said culture.

The transformed hosts can be grown in fermentors and cultured according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention, can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). The antibody or its corresponding immunoglobulin chain(s) of the invention can then be isolated from the growth medium, cellular lysates, or cellular membrane fractions. The isolation and purification of the, e.g., microbially expressed antibodies or immunoglobulin chains of the invention may be by any conventional means such as, for example, preparative chromatographic separations and immunological separations such as those involving the use of monoclonal or polyclonal antibodies directed, e.g., against the constant region of the antibody of the invention.

It will be apparent to those skilled in the art that the antibodies of the invention can be further coupled to other moieties for, e.g., drug targeting and imaging applications. Such coupling may be conducted chemically after expression of the antibody or antigen to site of attachment or the coupling product may be engineered into the antibody or antigen of the invention at the DNA level. The DNAs are then expressed in a suitable host system, and. the expressed proteins are collected and renatured, if necessary.

In a preferred embodiment of the present invention, the antibody is coupled to an effector, such as a radioisotope or a toxic chemotherapeutic agent. Preferably, these antibody conjugates are useful in targeting cells, e.g. cancer cells, expressing AXL, for elimination. The linking of

antibodies/antibody fragments of the invention to radioisotopes e.g. provides advantages to tumor treatments. Unlike chemotherapy and other forms of cancer treatment, radioimmunotherapy or the administration of a radioisotope-antibody combination directly targets the cancer cells with minimal damage to surrounding normal, healthy tissue. Preferred radioisotopes include e.g. ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I.

Furthermore, the antibodies of the invention can be used to treat cancer when being conjugated with toxic chemotherapeutic drugs such as geldanamycin (Mandler et al., J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51 (2000» and maytansin, for example, the maytansinoid drug, DM1 (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996) and auristatin-E or monomethylauristatin-E (Doronina et al., Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003) or calicheamicit);. Different linkers that release the drugs under acidic or reducing conditions or upon exposure to specific proteases are employed with this technology. The antibodies of the invention may be conjugated as described in the art.

The invention further relates to a pharmaceutical composition comprising the antibody, the nucleic acid molecule, the vector, the host of the invention or an antibody obtained by the method of the invention.

The term "composition" as employed herein comprises at least one compound of the invention. Preferably, such a composition is a pharmaceutical or a diagnostic composition.

It is preferred that said pharmaceutical composition comprises a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent. The herein disclosed pharmaceutical composition may be partially useful for the treatment of disorders associated with, accompanied by or caused by AXL expression, overexpression or hyperactivity, e.g. hyperproliferative diseases, cardiovascular diseases, in particular artherosclerosis and thrombosis, diabetes related diseases, in particular glomerular hypertrophy or diabetic

nephropathy. Said disorders comprise, but are not limited to cancer, e.g. breast cancer, colon cancer, lung cancer, kidney cancer, follicular lymphoma, myeloid leukemia, skin cancer/melanoma, glioblastoma, ovarian cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, Barrett's esophagus and esophageal cancer, stomach cancer, bladder cancer, cervical cancer, liver cancer, thyroid cancer, and head and neck cancer, or other hyperplastic or neoplastic diseases or other AXL expressing or overexpressing diseases.

The term "hyperactivity" herein refers to uncontrolled AXL signaling which may be caused by a lack and/or dysfunction of negative regulation. By way of example negative regulation comprises protein dephosphorylation, degradation and/or endocytosis. Moreover uncontrolled AXL signaling may be the result of genetic alterations, either somatic or germline, which result in changes of the AXL amino acid sequence.

Examples of suitable pharmaceutical carriers, excipients and/or diluents are well known in the art and include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions etc. Compositions comprising such carriers can be formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, e.g., by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical, intradermal, intranasal or intrabronchial administration. The compositions of the invention may also be administered directly to the target site, e.g., by biolistic delivery to an external or internal target site, like the brain. The dosage regimen will be determined by the attending physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Proteinaceous pharmaceutically active matter may be present in amounts between 1 µg and 100 mg/kg body weight per

dose; however, doses below or above this exemplary range are envisioned, especially considering the aforementioned factors. If the regimen is a continuous infusion, it should also be in the range of 1 pg to 100 mg per kilogram of body weight per minute.

Progress can be monitored by periodic assessment. The compositions of the invention may be administered locally or systemically. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or' fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present such as, for example, antimicrobials, anti-oxidants, chelating agents, and inert gases and the like. Furthermore, the pharmaceutical composition of the invention may comprise further agents depending on the intended use of the pharmaceutical composition. It is particularly preferred that the pharmaceutical composition comprises further active agents like, e.g. an additional antineoplastic agent, small molecule inhibitor, anti-tumor agent or chemotherapeutic agent.

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising an anti-AXL-antibody, which is preferably the antibody of the invention in combination with at least one further antineoplastic agent. Said combination is effective, for example, in inhibiting abnormal cell growth.

Many antineoplastic agents are presently known in the art. In general the term includes all agents that are capable of prevention, alleviation and/or treatment of hyperproliferative disorders. In one embodiment, the

antineoplastic agent is selected from the group of therapeutic proteins including but not limited to antibodies or immunomodulatory proteins. In another embodiment the antineoplastic agent is selected from the group of small molecule inhibitors or chemotherapeutic agents consisting of mitotic inhibitors, kinase inhibitors, alkylating agents, anti-metabolites, intercalating antibiotics, growth factor inhibitors, cell cycle inhibitors, enzymes, topoisomerase inhibitors, histone deacetylase inhibitors, anti-survival agents, biological response modifiers, anti-hormones, e. g. anti-androgens, and antiangiogenesis agents.

Specific examples of antineoplastic agents which can be used in combination with the antibodies provided herein include, for example, gefitinib, lapatinib, sunitinib, pemetrexed, bevacisumab, cetuximab, imatinib, trastuzumab, alemtuzumab, rituximab, erlotinib, bortezomib and the like. Other specific antineoplastic agents to be used in the compositions as described and claimed herein include for example, chemotherapeutic agents such as capecitabine, daunorubicin, daunomycin, dactinomycin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, esorubicin, bleomycin, mafosfamide, ifosfamide, cytosine arabinoside, bis-chloroethylnitrosurea, busulfan, mitomycin C, actinomycin D, mithramycin, prednisone, hydroxyprogesterone, testosterone, tamoxifen, dacarbazine, procarbazine, hexamethylmelamine, pentamethylmelamine, mitoxantrone, amsacrine, chlorambucil, methylcyclohexylnitrosurea, nitrogen mustards, melphalan, cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine (CA), 5-azacytidine, hydroxyurea, deoxycoformycin, 4-hydroxyperoxycyclophosphoramide, 5-fluorouracil (5-FU), 5-fluorodeoxyuridine (5-FUdR), methotrexate (MTX), colchicine, taxol, vincristine, vinblastine, etoposide, trimetrexate, teniposide, cisplatin and diethylstilbestrol (DES). See, generally, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. In particular preferred are such antineoplastic agents that induce apoptosis.

When used with the described AXL antibodies, such antineoplastic agents

may be used individually (e.g., 5-FU and an antibody), sequentially (e.g., 5-FU and an antibody for a period of time followed by MTX and an antibody), or in combination with one or more other such antineoplastic agents (e.g., 5-FU, MTX and an antibody, or 5-FU, radiotherapy and an antibody).

The term antineoplastic agent may also include therapeutic procedures, as for example irradiation or radiotherapy.

The pharmaceutical composition of the invention can be used in human medicine and can be used also for veterinary purposes.

Additionally, the invention relates to the use of the antibody of the invention, the nucleic acid molecule, the vector, the host of the invention or an antibody obtained by the method of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, cardiovascular diseases, in particular artherosclerosis and thrombosis, diabetes related diseases, in particular glomerular hypertrophy or diabetic nephropathy, and particularly of disorders associated with, accompanied by or caused by AXL expression, overexpression or hyperactivity.

A hyperproliferative disease as mentioned above includes any neoplasia, i.e. any abnormal and/or uncontrolled new growth of tissue. The term "uncontrolled new growth of tissue" as used herein may depend upon a dysfunction and/or loss of growth regulation. A hyperproliferative disease includes tumor diseases and/or cancer, such as metastatic or invasive cancers.

In a preferred embodiment of the use of the invention, said hyperproliferative disease is in particular breast cancer, colon cancer, lung cancer, kidney cancer, follicular lymphoma, myeloid leukemia, skin cancer/melanoma, glioblastoma, ovarian cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, Barrett's esophagus and esophageal cancer, stomach cancer, bladder cancer,

cervical cancer, liver cancer, thyroid cancer, and head and neck cancer, or hyperplastic or neoplastic diseases or other AXL expressing or overexpressing hyperproliferative diseases.

In yet another embodiment the present invention refers to the use of an anti-AXL-antibody, preferably the antibody of the present invention for the manufacture of a medicament for the co-administration with an antineoplastic agent for the treatment of one of the above mentioned disorders.

According to a further preferred embodiment the present invention is directed to the use of an anti-AXL antibody for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of drug resistant cancer. In a particularly preferred embodiment, the anti-AXL antibody is a monoclonal antibody as defined in claims 1-22.

Further the present invention relates to a diagnostic composition comprising the antibody of the invention, the nucleic acid molecule, the vector, the host of the invention or an antibody obtained by the method of the invention and optionally a pharmaceutically acceptable carrier.

The diagnostic composition of the invention is useful in the detection of an undesired expression, overexpression or hyperactivity of the mammalian AXL in different cells, tissues or another suitable sample, comprising contacting a sample with an antibody of the invention, and detecting the presence of AXL in the sample. Accordingly, the diagnostic composition of the invention may be used for assessing the onset or the disease status of a hyperproliferative disease.

Furthermore, malignant cells, such as cancer cells expressing AXL, can be targeted with the antibody of the invention. The cells which have bound the antibody of the invention might thus be attacked by immune system functions such as the complement system or by cell-mediated cytotoxicity,

thereby reducing the number of or eradicating cancer cells. These considerations equally apply to the treatment of metastases and re-current tumors.

In another aspect of the present invention, the antibody of the invention is coupled to a labelling group. Such antibodies are particularly suitable for diagnostic applications. As used herein, the term "labelling group" refers to a detectable marker, e.g. a radiolabelled amino acid or biotinyl moieties that can be detected by marked avidin. Various methods for labelling polypeptides and glycoproteins, such as antibodies, are known in the art and may be used in performing the present invention. Examples of suitable labelling groups include, but are not limited to, the following: radioisotopes or radionuclides (e.g. ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), fluorescent groups (e.g. FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), enzymatic groups (e.g. horseradish peroxidase, β-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase), chemiluminescent groups, biotinyl groups, or predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g. leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags).

In certain aspects, it may be desirable, that the labelling groups are attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance.

In another embodiment the present invention relates to a method of assessing for the presence of AXL expressing cells comprising contacting the antibody of the invention with cells or a tissue suspected of carrying AXL on their/its surface. Suitable methods for detection of AXL expression in a sample may be an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) or Immunohistochemistry (IHC).

An ELISA assay may be carried out in a microtiter plate format, wherein e.g. wells of a microtiter plate, are adsorbed with an AXL antibody. The wells are rinsed and treated with a blocking agent such as milk protein or albumin to

prevent nonspecific adsorption of the analyte. Subsequently the wells are treated with a test sample. After rinsing away the test sample or standard, the wells are treated with a second AXL antibody that is labelled, e.g. by conjugation with biotin. After washing away excess secondary antibody, the label is detected, e.g. with avidin-conjugated horseradish peroxidase (HRP) and a suitable chromogenic substrate. The concentration of the AXL antigen in the test samples is determined by comparison with a standard curve developed from standard samples.

For IHC, paraffin-embedded tissues may be used, wherein the tissues are, e.g. first deparaffinized in xylene and then dehydrated, e.g. with ethanol and rinsed in distilled water. Antigenic epitopes masked by formalin-fixation and paraffin-embedding may be exposed by epitope unmasking, enzymatic digestion or saponin. For epitope unmasking paraffin sections may be heated in a steamer, water bath or microwave oven for 20-40 min in an epitope retrieval solution as for example 2N HCl solution (pH 1.0). In the case of an enzyme digestion, tissue sections may be incubated at 37°C for 10-30 minutes in different enzyme solutions such as proteinase K, trypsin, pronase, pepsin etc.

After rinsing away the epitope retrieval solution or excess enzyme, tissue sections are treated with a blocking buffer to prevent unspecific interactions. The primary AXL antibody is added at appropriate concentrations. Excess primary antibody is rinsed away and sections are incubated in peroxidase blocking solution for 10 min at room temperature. After another washing step, tissue sections are incubated with a secondary labelled antibody, e.g. labelled with a group that might serve as an anchor for an enzyme. Examples therefore are biotin labelled secondary antibodies that are recognized by streptavidin coupled horseradish peroxidase. Detection of the antibody/enzyme complex is achieved by incubating with a suitable chromogenic substrate.

In an additional embodiment the present invention relates to a method of

blocking AXL function comprising contacting the antibody of the invention with cells or a tissue suspected of carrying AXL on their/its surface under conditions, wherein the antibody is capable of blocking AXL function. The contacting may be in vitro or in vivo.

The invention also relates to a method of treating a hyperproliferative disease, cardiovascular diseases, in particular artherosclerosis and thrombosis, diabetes related diseases, in particular glomerular hypertrophy or diabetic nephropathy, comprising, administering to a patient in need thereof a suitable dose of the antibody or antibody fragment or derivative thereof of the present invention. The hyperproliferative disease is preferably selected from disorders associated with, accompanied by or caused by AXL expression, overexpression or hyperactivity, such as cancer, e.g. breast cancer, colon cancer, lung cancer, kidney cancer, follicular lymphoma, myeloid leukemia, skin cancer/melanoma, glioblastoma, ovarian cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, Barrett's esophagus and esophageal cancer, stomach cancer, bladder cancer, cervical cancer, liver cancer, thyroid cancer, and head and neck cancer, or hyperplastic and neoplastic diseases or other AXL expressing or overexpressing hyperproliferative diseases.

According to another preferred embodiment of the invention the cancer to be treated is a drug resistant cancer.

The invention further relates to a method of treating a disease wherein the antibody of the invention is administered to a mammal and wherein said disease is correlated directly or indirectly with the abnormal level of expression or activity of AXL.

Finally, the invention relates to a kit comprising an anti-AXL-antibody, preferably the antibody, antibody fragment or derivative thereof of the invention, the nucleic acid molecule encoding said components and/or the vector of the invention.

All embodiments covering the compounds disclosed herein can be used as single compounds or in combination for the preparation of a medicament.

Figure Legends

Figure 1. Flow cytometry analysis of cell surface AXL in Ratl-Mock and Ratl-AXL cl.2 fibroblasts. Polyclonal Ratl-Mock and clonal Ratl-AXL cl.2 cells, generated by infection of Ratl fibroblasts with pLXSN and pLXSN-hAXL ecotrophic virus, respectively, were collected and stained with mouse control antibody 72A1 (left panel) or mouse anti-AXL MAB154 primary antibody (right panel) at 3 µg/ml and PE-conjugated anti-mouse secondary antibody. See text for details. Staining of Ratl-AXL cl.2 cells results in a shift by three orders of magnitude and demonstrates AXL overexpression on the surface of these cells.

Figure 2. Flow cytometry analysis of cell surface AXL in NIH3T3-Mock and NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts. Polyclonal NIH3T3-Mock and clonal NIH3T3-AXL cl.7 cells, generated by infection of NIH3T3 fibroblasts with pLXSN and pLXSN-AXL ecotrophic virus, respectively, were collected and stained with mouse control antibody 72A1 (left panel) or mouse anti-AXL MAB154 primary antibody (right panel) at 3 µg/ml and PE-conjugated anti-mouse secondary antibody. See text for details. Staining of NIH3T3-AXL cl.7 cells results in a shift by two orders of magnitude and demonstrates AXL overexpression on the surface of these cells.

Figure 3. Flow cytometry analysis of cross-reactivity of rat-anti AXL antibodies with mouse and cynomolgus monkey AXL as well as human Mer and Sky. HEK293T fibroblasts were transiently transfected with pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer, or pcDNA3-hSky. Cells were collected and stained with 10 µg/ml anti-AXL 1D5, 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 or 12B7 primary antibody and/or PE-conjugated donkey anti-rat secondary antibody, or PE-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody only for control. See text for details. Except 12B7 which shows moderate cross-reactivity with mouse AXL as well as human Mer and Sky, non of the anti-AXL antibodies cross-reacted with these molecules. In contrast, all tested anti-AXL antibodies cross-reacted with

cynomolgus monkey AXL.

Figure 4. ELISA experiments to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on AXL receptor phosphorylation. NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts (A) and NCI-H292 lung cancer cells (B) were starved, pre-incubated with 10 µg/ml of mouse control antibody 72A1 as well as the rat anti-AXL antibodies 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7, or 10D12, treated with or without 400 ng/ml mGas6, and lysed. Lysates were transferred to anti-phospho-tyrosine antibody 4G10-coated Maxi-Sorp 96 well plates, which then were washed and incubated with 0.5 µg/ml biotinylated rat anti-AXL antibody 12B7, AP-conjugated streptavidin and AttoPhos substrate solution in order to collect fluorescence intensities. See text for details. The rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, and 10D12 were able to block or reduce ligand-mediated AXL activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 stimulate basal AXL activation as indicated by increased phosphorylation, do not significantly reduce ligand-mediated AXL activation, and are therefore considered agonistic anti-AXL antibodies.

Figure 5. ELISA experiments to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on p42/p44 MAP-Kinase phosphorylation. CaSki cervical cancer cells were starved, pre-incubated with 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5 as well as the rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, or 2A1, treated with or without 400 ng/ml mGas6, and fixed with formaldehyde. Cells were washed, quenched and incubated with anti-phospho-p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) primary antibody, HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody and Tetramethylbenzidine solution in order to measure absorbance intensities. See text for details. The rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 were able to reduce ligand-mediated p42/p44 MAP-Kinase activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibody 2A1 stimulates basal p42/p44 MAP-Kinase activation as indicated

by increased phosphorylation, does not reduce ligand-mediated p42/p44 MAP-Kinase activation, and is therefore considered an agonistic anti-AXL antibody.

Figure 6. ELISA experiments to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on Akt-Kinase phosphorylation. NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts (A) and CaLu-1 lung cancer cells (B) were starved, pre-incubated with 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5 as well as the rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, or 2A1, treated with or without 400 ng/ml mGas6, and fixed with formaldehyde. Cells were washed, quenched and incubated with anti-phospho-Akt (Ser473) primary antibody, HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody and Tetramethylbenzidine solution in order to measure absorbance intensities. See text for details. The rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 were able to block or reduce ligand-mediated Akt-Kinase activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibody 2A1 stimulates basal Akt-Kinase activation as indicated by increased phosphorylation, does not reduce ligand-mediated Akt-Kinase activation, and is therefore considered an agonistic anti-AXL antibody.

Figure 7. ELISA experiments to compare the effects of rat and chimeric anti-AXL antibodies on Akt-Kinase phosphorylation. NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts were starved, pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, and 1 µg/ml of rat anti-AXL antibody 11B7 or chimeric anti-AXL antibody ch11B7, as well as 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-AXL antibody 11D5 or chimeric anti-AXL antibody ch11D5, treated with or without 400 ng/ml mGas6, and fixed with formaldehyde. Cells were washed, quenched and incubated with anti-phospho-Akt (Ser473) primary antibody, HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody and Tetramethylbenzidine solution in order to measure absorbance intensities. See text for details. Rat anti-AXL antibody 11B7 and chimeric anti-AXL antibody ch11B7 as well as rat anti-AXL antibody 11D5 or chimeric anti-AXL antibody ch11D5 were able to inhibit ligand-mediated Akt-

Kinase activation to similar extent as indicated by decreased phosphorylation. Thus, as compared to their respective rat counterparts, the chimeric anti-AXL antibodies ch11B7 and ch11D5 maintained activity.

Figure 8. Competition ELISA experiments to investigate binding properties of rat anti-AXL antibodies. 96 well Maxi-Sorp plates were coated with 1 µg/ml human AXL-ECD and pre-incubated with 10 µg/ml of unbiotinylated isotypic control antibody 1D5 or rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, or 2A1. After incubation with 0.5 µg/ml biotinylated isotypic control antibody 1D5 or biotinylated rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, or 2A1, and addition of AP-conjugated Streptavidin and AttoPhos substrate solution, fluorescence was collected to measure bound biotinylated antibodies. See text for details. The control antibody 1D5 did not bind to AXL-ECD. The antagonistic anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, and 10D12 competed with each other for the same or structurally adjacent epitopes. The agonistic antibodies 11D7 and 2A1 recognize different epitopes and do not compete with the antagonistic antibodies for binding to the AXL-ECD.

Figure 9. Wound healing/scratch assay to investigate the effects of rat and chimeric anti-AXL antibodies on cell migration and proliferation. After grown to confluency, NCI-H292 lung cancer cells were starved and wounded with a pipette tip. In the presence of 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, 6E7, or 10D12, the chimeric anti-AXL antibodies chn11D5 IgG2 and chn11B7 IgG2, the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7, as well as 10 µg/ml of Erbitux or 5µM Sutent, cells were permitted to re-populate the area of clearing, After 24 h, cells were fixed and stained, and photos of the wounds were taken. See text for details. Compared to the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, 6E7, and 10D12, as well as the chimeric anti-AXL antibodies chn11D5 IgG2 and chn11B7 IgG2 reduced the re-population of the cleared area, whereas the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 led to complete wound closure.

Figure 10. Boyden chamber/transwell assay to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on directed cell migration. Serum starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts were pre-incubated with 10 µg/ml of the rat anti-AXL antibodies 4A6, 11B7 or 2A1, plated on top of collagen I-coated FluoreBlock inserts and exposed to serum-free medium with or without Gas6 in the lower compartment. After 7 h, transmigrated cells were stained with calcein-AM, and fluorescence of each well was measured. See text for details. The antagonistic anti-AXL antibody 11B7 reduced both basal and Gas6-induced migration of NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, whereas the agonistic rat anti-AXL antibody 2A1 increased ligand-induced and, in particular, basal migration of NIH3T3-AXL cl.7 cells. The antibody 4A6 did not affect directed cell migration.

Figure 11. AlamarBlue™ assay to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on Gas6-induced cell proliferation. Serum starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts were pre-incubated with 20 µg/ml of the mouse control antibody 72A1, the rat antagonistic anti-AXL antibodies 11D5 and 11B7, as well as the agonistic anti-AXL antibody 2A1, and grown in the absence or presence of 400 ng/ml Gas6. After 4 days, AlamarBlue™ was added to the cells and absorbance was measured. See text for details. The antagonistic anti-AXL antibodies 11D5 amd 11B7 inhibited Gas6-induced proliferation of NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, whereas the agonistic rat anti-AXL antibody 2A1 increased ligand-induced and, in particular, basal proliferation of NIH3T3-AXL cl.7 cells.

Figure 12. Caspase-3/7 assay to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on Gas6-mediated anti-apoptosis. Serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts were pre-incubated with 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5, or the agonistic rat anti-AXL antibodies 11D7 and 2A1, and treated with or without Gas6. Apo-ONE substrate solution was added and flourescence was collected to measure caspase-3/7 activity. See text for details. Compared to

the isotypic control antibody, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 reduced Gas6-mediated anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, and thus induced apoptosis. In contrast, the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 induced anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 cells regardless of the absence or presence of Gas6, and therefore inhibited apoptosis.

Figure 13. Spheroid-based cellular angiogenesis assay to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on VEGF-A-induced endothelial cell sprouting. HUVEC spheroids were embedded in a 3D collagen gel, stimulated with 25 ng/ml VEGF-A and treated with indicated concentrations of the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 (A) and 11D5 (B) for 24 h. The mean ± SEM of the cumulative sprout length of 10 randomly selected spheroids per data point was analyzed (left panel) and the relative inhibition by the antibody was determined (right panel). Fitting of IC_{50} curves and calculation of IC_{50} values was performed with GraphPad Prism 4.03. See text for details. The antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 inhibited VEGF-A-stimulated HUVEC sprouting in the spheroid-based angiogenesis assay in a dose-dependent manner. Whereas treatment with the highest concentration of 11B7 reduced HUVEC sprouting to basal levels, inhibition with the highest concentration of 11D5 was not as effective (left panel). HUVEC sprouting was inhibited with IC_{50} values of 9.8×10^{-8} M and 7.0×10^{-7} M for 11B7 and 11D5, respectively (right panel).

Figure 14. Orthotopic xenograft model to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on human prostate carcinoma growth in nude mice. PC-3-LN prostate carcinoma cells were orthotopically implanted into the prostate of $NMRI^{nu/nu}$ mice. Animals were randomized into 4 groups and received 25 mg/kg of the isotypic control antibody 1D5 or the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7, as well as 40 mg/kg Sutent or 12.5 mg/kg Taxotere. During the treatment period, the growth of orthotopically growing PC-3-LN tumors as well as peripheral metastases was monitored once weekly via *in vivo* bioluminescence imaging on day 15, day 23, day 29, and day 34. See

text for details. Compared to the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 reduced the overall growth of PC-3-LN prostate tumors in nude mice.

Figure 15. Orthotopic xenograft model to investigate the effects of rat anti-AXL antibodies on human prostate carcinoma metastasis in nude mice. PC-3-LN prostate carcinoma cells were orthotopically implanted into the prostate of NMRI$^{-nu/nu}$ mice. Animals were randomized into 4 groups and received 25 mg/kg of the isotypic control antibody 1D5 or the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7, as well as 40 mg/kg Sutent or 12.5 mg/kg Taxotere. Post necropsy, selected organs (liver, spleen, lung, femur, and a part of the lumbar spine) were collected and analyzed for the presence of metastases via bioluminescence imaging. See text for details. Compared to the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 of the invention reduced the occurrence of spleen metastases. Noteworthy, the anti-metastatic effect of 11B7 in this experiment was stronger than that of Sutent.

Figure 16. Immunhistochemical analysis of AXL expression in different human malignancies. 17 human solid tumor types, each represented by pairs of tumor tissue and matching non-malignant tissue, were analyzed with regard to AXL expression by immunhistochemistry. See text for details. Results are summarized (A), whereby an intensity of 1 refers to weak staining in more than 25% of inspected cells. Examples of most intense staining as observed in mammary tumors and a signet ring cell carcinoma of the stomach are displayed (B).

Figure 17. ELISA experiments to compare the effects of rat and chimeric anti-Axl antibodies on Axl phosphorylation. CaSki cervical cancer cells were starved, pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-Axl antibody 11B7 (A) or chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B), treated with or without 400 ng/ml mGas6, and lysed. Lysates were transferred to anti-phospho-tyrosine

antibody 4G10-coated Maxi-Sorp 96 well plates. Afterwards, plates were washed and incubated with 0.5 µg/ml of biotinylated rat anti-Axl antibody 12B7, AP-conjugated streptavidin, and AttoPhos substrate solution in order to collect fluorescence intensities. See text for details. As demonstrated by concentration-dependent decrease of the relative Axl phosphorylation in the cervical cancer cell line CaSki, the rat anti-Axl antibody 11B7 (A) and the chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B) of the invention were able to block ligand-induced activation of the receptor tyrosine kinase Axl to similar extent.

Figure 18. ELISA experiments to compare the effects of rat and chimeric anti-Axl antibodies on Axl phosphorylation. CaSki cervical cancer cells were starved, pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-Axl antibody 11B7 (A) or chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B), treated with or without 400 ng/ml mGas6, and fixed with formaldehyde. Cells were washed, quenched and incubated with anti-phospho-p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) primary antibody, HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody and Tetramethyl-benzidine solution in order to measure absorbance intensities. See text for details. The rat anti-Axl antibody 11B7 (A) and the chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B) of the invention were able to block Gas6-induced activation of p42/p44 MAP-Kinase in CaSki cervical cancer cells to similar extent as indicated by concentration-dependent decrease of the relative p42/p44 MAP-Kinase phosphorylation.

Figure 19. TUNEL staining to investigate the combinatorial effect of rat anti-AXL antibodies and chemotherapeutic agents to overcome drug resistance in human ovarian cancer cells. Human NCI/ADR-RES ovarian cancer cells were pre-incubated with 10 µg/ml of control antibody or the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 and co-incubated with doxorubicin at final concentrations of 100 µM, 150 µM, or 200 µM. Applying a commercially available kit, TUNEL staining was performed in order to visualize and determine apoptosis. See text for details. No TUNEL staining, and hence no apoptosis, was observed with NCI/ADR-RES ovarian cancer cells that were

treated with 100 µM of doxorubicin, regardless of whether cells have been co-incubated with control antibody or the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 (top). However, at a concentration of 150 µM of doxorubicin, only very week apoptosis could be detected in cells co-treated with control antibody, whereas co-incubation with the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 resulted in a substantial induction of apoptosis (middle). Also in the presence of 200 µM of doxorubicin, co-incubation of cells with 11B7 significantly increased apoptosis rates as compared to cells being incubated with control IgG antibody (bottom), indicating that co-treatment of even multi drug-resistant tumor cells with both chemotherapeutic agents and antagonistic anti-Axl antibodies of the invention may be suitable to overcome drug resistance.

Figure 20. Soft agar assay to investigate the combinatorial effect of rat anti-AXL antibodies and chemotherapeutic agents on anchorage-independent growth of human melanoma cells. Human C-8161 melanoma cells either remained untreated or were incubated with the rat antagonistic anti-AXL antibody 11B7 at a final concentration of 2.5 µg/ml. Combined with cisplatin at the indicated concentrations, agar-embedded cells were allowed to grow on top of a 0.7% bottom agar layer for 5 days. Stained with MTT, the area of colonies was then measured. See text for details. Absolute numbers reflecting the overall area of colonies (A) and the relative growth inhibition (B) calculated on the basis of these data are shown. As compared to untreated control cells, incubation with cisplatin led to colony growth retardation in a dose-dependent manner. In line with the inhibitory effect of 11B7 alone in the range of 30%, combination with the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 resulted in a significantly potentiated inhibitory effect of cisplatin on soft agar growth of C-8161 melanoma cells, particularly at lower concentrations of cisplatin.

Further, the present invention shall be explained by the following examples and the accompanying drawing figures.

Examples

General comment

The following examples, including the experiments conducted and results achieved, are provided for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting upon the present invention.

Example 1. Generation of AXL overexpressing Ratl fibroblasts as immunogen and AXL overexpressing NIH3T3 fibroblasts as experimental model system

The full length coding sequence for the human receptor tyrosine kinase AXL transcript variant 1 according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference sequence (NM_021913) was subcloned into pLXSN via flanking recognition elements for the restriction endonucleases *Eco*RI and *Bam*HI, thereby resulting in the retroviral expression vector pLXSN-hAXL.

For the generation of antibodies that specifically bind to human receptor tyrosine kinase AXL, Ratl fibroblasts stably overexpressing human AXL were generated by retroviral gene transfer. In brief, $3x10^5$ Phoenix-E cells were seeded on 60 mm culture dishes and transfected with 2 µg/ml pLXSN vector or pLXSN-hAXL using the calcium phosphate method. After 24 h, medium was replaced by fresh medium in which Phoenix-E cells were incubated for 4 h. The supernatants of Phoenix-E cells releasing pLXSN or pLXSN-hAXL ecotrophic virus were harvested and used for the incubation of subconfluent Ratl cells ($2x10^5$ cells per 6 cm dish) for 3 h in the presence of Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Simultaneously, Phoenix-E cells were re-incubated with fresh medium, which after another 3 h was used for a second infection of the Ratl fibroblasts in the presence of Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Likewise, a third infection cycle was performed. After changing the medium, selection of Ratl cells with G418 was started. Usually, stable clones were picked after selection for 21 days.

A panel of stable clones was propagated and quantified for membrane-localized human AXL expression by FACS analysis. In detail, $1x10^5$ cells were harvested with 10 mM EDTA in PBS, washed once with FACS buffer (PBS, 3% FCS, 0.4% azide) and seeded on a 96 well round bottom plate. The cells were spun for 3 min at 1,000 rpm to remove supernatant and were resuspended with mouse anti-AXL primary antibody MAB154 (R&D Systems, 3 µg/ml). Cell suspensions were incubated on ice for 1 h, washed twice with FACS buffer and resuspended in 100 µl/well of PE-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson) diluted 1:50 in FACS buffer. The cell suspensions were incubated on ice and in the dark for 30 min, washed twice with FACS buffer and analyzed using an Epics XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter).

Figure 1 shows the FACS analysis of the polyclonal Ratl-Mock population stably infected with pLXSN empty vector and Ratl-AXL cl.2 stably infected with pLXSN-hAXL, and demonstrates AXL overexpression on the cell surface of this representative clone.

Additionally, in order to generate a suitable cellular model system for experimental purposes, NIH3T3 fibroblasts stably overexpressing AXL were generated in analogy to procedures described for Ratl. In brief $3x10^5$ Phoenix-E cells were seeded on 60 mm culture dishes and transfected with 2 µg/ml pLXSN vector or pLXSN-AXL cDNA using the calcium phosphate method. After 24 h, medium was replaced by fresh medium in which Phoenix-E cells were incubated for 4 h. The supernatants of Phoenix-E cells releasing pLXSN or pLXSN-hAXL ecotrophic virus were harvested and used for the incubation of subconfluent NIH3T3 cells ($2x10^5$ cells per 6 cm dish) for 3 h in the presence of Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Simultaneously, Phoenix-E cells were re-incubated with fresh medium, which after another 3 h was used for a second infection of the NIH3T3 fibroblasts in the presence of Polybrene (4 mg/ml; Aldrich). Likewise, a third infection cycle was performed. After changing the medium, selection of NIH3T3 cells with G418

was started. Usually, stable clones were picked after selection for 21 days.

A panel of stable clones was propagated and quantified for membrane-localized AXL expression by FACS analysis. In detail, $1x10^5$ cells were harvested with 10 mM EDTA in PBS, washed once with FACS buffer (PBS, 3% FCS, 0.4% azide) and seeded on a 96 well round bottom plate. The cells were spun for 3 min at 1000 rpm to remove supernatant and were resuspended with mouse anti-AXL primary antibody MAB154 (R&D Systems, 3 µg/ml). Cell suspensions were incubated on ice for 1 h, washed twice with FACS buffer and resuspended in 100 µl/well of PE-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson) diluted 1:50 in FACS buffer. The cell suspensions were incubated on ice and in the dark for 30 min, washed twice with FACS buffer and analyzed using an Epics XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter).

Figure 2 shows the FACS analysis of the polyclonal NIH3T3-Mock population stably infected with pLXSN empty vector and NIH3T3-AXL cl.7 stably infected with pLXSN-hAXL, and demonstrates AXL overexpression on the cell surface of this representative clone.

Example 2. Generation of rat anti-AXL monoclonal antibodies

Monoclonal rat anti-AXL antibodies were raised by injection of approximately $10x10^6$ frozen cells of RatI-AXL cl.2 both i.p. and subcutaneously into Lou/C or Long Evans rats. After an 8-week interval, a final boost was given i.p and subcutaneously 3 d before fusion. Fusion of the myeloma cell line P3X63-Ag8.653 with the rat immune spleen cells was performed according to standard procedures and yielded 105 hybridomas. After 2 weeks, first supernatants from hybridomas were collected and tested in a primary FACS screen for binding to NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts versus NIH3T3-Mock control cells. Clones positive for AXL binding were further cultivated. From 50 ml supernatant of these clones, antibodies were purified and re-analyzed for specific binding to AXL on NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts versus NIH3T3-

Mock control cells. Purified antibodies specifically binding to NIH3T3-AXL cl. 7 fibroblasts but not NIH3T3-Mock control cells were furthermore tested in Akt-Kinase phosphorylation ELISAs, and ELISAs to determine the isotype were performed. For purification of rat antibodies, supernatants were spun for 20 minutes at 5,000g and subsequently sterile filtered. 500 µl of protein G sepharose FF were added and incubated at 4°C for at least 1 h on a spinning wheel. Sepharose was spun down, supernatant discarded and protein G matrix was washed twice with PBS prior to protein elution utilizing citrate buffer (100mM) pH 2.1. Elution fractions were immediately rebuffered to neutral pH by adding 1M Tris pH 8.0 and dialyzed against PBS.

Of the oligoclonal antibodies tested, 91 specifically bound to NIH3T3-AXL cl. 7 fibroblasts but not NIH3T3-Mock control cells, 9 inhibited Gas6-induced Akt phosphorylation in the same cells, whereas 71 stimulated Akt phosphorylation. Four antagonistic antibodies (I11B7, I10D12, I6E7, and III11D5, in the following examples referred to as 11B7, 10D12, 6E7 and 11D5, respectively), two agonistic antibodies (I11D7 and III2A1; in the following examples referred to as 11D7 and 2A1) and one control antibody (III1D5; in the following examples referred to as 1D5) were kryoconserved and subcloned.

Nr.	clone	subclass	FACS shift NIH3T3-pLXSN control	FACS shift NIH3T3-hAXL-Ci8
1	I 1B11	2a	0,8	53,8
2	I 1C8	IgM/2a	0,9	55,0
3	I 2F3	2a	0,8	52,4
4	I 6E7	2a	1,8	62,3
5	I 7E6	2a	0,8	47,1
6	I 7G1	G1	0,7	32,0
7	I 7G11	G1	3,5	8,8
8	I 8E5	G1	1	33,0
9	I 9H3	G1	0,5	40,4
10	I 10A10	IgM/2a	0,5	32,6
11	I 10D9	2a	0,7	47,4
12	I 10D12	G1	0,5	37,5
13	I 11B7	IgM/G1/2c	0,6	36,2

14	I 11D7	IgM/2a	0,7	9,6
15	I 12B7	2a/2c	0,8	43,6
16	II 2B8	IgM/G1	0,6	2,5
17	II 2D4	2a	0,8	46,5
18	II 6A5	G1	0,6	13,1
19	II 8A8	2a	0,6	34,6
20	III 1A10	2a	1,4	54,5
21	III 1B1	2a	7,5	24,6
22	III 1B3	IgM/2a	1,1	53,3
23	III 1B6	2b	1,1	15,3
24	III 1B11	2b	1,1	11,1
25	III 1C3	2b	1,0	24,2
26	III 1C10	-	1,1	22,1
27	III 1D2	IgM/2b	3,0	26,6
28	III 11D5	2a	1,5	8,9
29	III 1D7	2b	1,0	17,3
30	III 1D11	-	1,1	10,9
31	III 1D12	2b	1,0	7,7
32	III 1E7	-	1,1	81,4
33	III 1E11	G1/2a	1,2	44,0
34	III 1F2	G1	1,2	42,2
35	III 1F3	2b	1,1	9,0
36	III 1G2	-	1,0	30,5
37	III 1G9	2a	1,3	89,2
38	III1G11	-	1,1	54,7
39	III 1G12	-	1,1	59,4
40	III 1H4	IgM/2b	1,0	20,0
41	III 1H8	2a/2b	1,0	10,1
42	III 1H9	2b	0,9	13,6
43	III 2A1	2a	1,0	36,0
44	III 2A2	2b	1,0	10,5
45	III 2A4	2b	1,2	11,8
46	III 2B1	2b	0,9	16,0
47	III 2B6	2a/2b	1,0	39,7
48	III 2B8	2a	1,0	53,3
49	III 2B10	2b	1,1	10,6
50	III 2C12	2a/2b	1,0	11,2
51	III 2D1	2a/2b	1,0	42,0
52	III 2D3	2b	0,9	17,8
53	III 2D8	2a	1,4	109,7
54	III 2D12	2b	1,8	16,0
55	III 2E11	2b	1,0	14,8
56	III 2G4	-	1,0	8,5
57	III 2H7	-	1,0	91,2
58	III 3A1	2a	1,5	82,5
59	III 3A2	2b	1,0	7,4
60	III 3A3	IgM/G1	2,0	49,6
61	III 3B2	-	1,0	11,3
62	III 3B3	2b	0,8	12,4
63	III 3B4	IgM	1,2	98,0
64	III 3B5	IgM/2b	1,6	74,0
65	III 3B7	2b	1,8	13,4

66	III 3B10	2a	1,1	70,6
67	III 3C3	-	1,3	45,7
68	III 3C4	-	1,4	15,2
69	III 3C10	2a	15,2	83,3
70	III 3C12	2b	1,2	41,8
71	III 3D2	2b	0,9	11,8
72	III 3D3	2a	1,0	54,5
73	III 3E1	-	1,2	49,7
74	III 3E3	2a/2b	1,3	16,0
75	III 3E5	2a	1,1	56,4
76	III 3F1	2b	1,0	9,8
77	III 3G1	2a	1,2	57,8
78	III 3G3	2a	1,1	45,7
79	III 3G6	2a	1,1	55,9
80	III 3H4	2b	1,0	43,3
81	III 3H5	2b	1,2	11,8
82	III 4A4	IgM	1,3	8,5
83	III 4A5	2a	1,9	32,8
84	III 4A6	2a	2,5	10,4
85	III 4B1	2b	1,9	10,2
86	III 4B5	2b	1,6	6,4
87	III 4B6	2a	1,9	56,8
88	III 4B9	IgM/2b/2c	1,7	16,6
89	III 4B11	2a	1,2	58,1
90	III 4C2	-	1,6	7,4
91	III 4C8	2a	12,8	21,3
92	III 4D1	-	1,6	7,9
93	III 4D9	-	1,1	31,2
94	III 4D10	2a	3,8	7,5
95	III 4E11	2b	1,5	7,6
96	III 4F6	-	1,2	5,5
97	III 4F8	2a	1,2	51,3
98	III 4F11	IgM	1,2	12,9
99	III 4F12	2a	1,1	52,6
100	III 4G2	2a	1,0	52,4
101	III4G11	IgM/2b	1,1	8,9
102	III 4H4	2b	3,1	61,3
103	III 4H5	2a	2,7	20,0
104	III 4H10	IgM/2a	1,3	49,2
105	III 4H11	IgM	3,3	124,0

Example 3. Rat anti-AXL antibodies of the invention do not cross-react with mouse AXL or other members of the human AXL family, Mer and Sky

This example addressed cross-reactivity of rat anti-AXL antibodies of the

invention with mouse and cynomolgus monkey AXL as well as with the other members of the human AXL family, human Mer and human Sky. Following subcloning of the mouse and monkey AXL coding sequence as well as human Mer and Sky into pcDNA3, each expression construct was transfected into HEK293T fibroblasts. The ability of rat anti-AXL antibodies of the invention to bind these proteins was tested by FACS analysis.

3 A. Cloning of mouse AXL

In the present study, the mouse AXL expression construct pcDNA3-mAXL was generated. The full length coding sequence of mouse AXL was polymerase chain reaction (PCR) amplified using mouse heart cDNA (Ambion) as template and appropriate primers according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference sequence (NM_009465) of mouse AXL. The full length sequence coding for mouse AXL was thereby covered by two overlapping PCR fragments, a 5'-fragment and 3'-fragment. The primers for amplification of these fragments were as follows:

Forward primer MOUSE1 for the 5'-fragment carrying an *Eco*RI recognition sequence:

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

Reverse primer MOUSE2 for the 5'-fragment:

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

Forward primer MOUSE3 for the 3'-fragment:

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

Reverse primer MOUSE4 for the 3'-fragment carrying a *Not*I recognition sequence:

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

The 5'-fragment was digested with *Eco*RI and *Bst*EII, the 3'-fragment was digested with *Bst*EII and *Not*I, and pcDNA3 was cleaved with *Eco*RI and *Not*I. A three factor ligation of the isolated and purified fragments was performed and transformed into DH5α bacterial cells. A single colony was picked and grown in the presence of ampicillin. Using a commercially available plasmid purification kit (Qiagen), the mouse AXL expression vector

pcDNA3-mAXL was purified, and sequence verified for subsequent transient transfection into HEK293T cells.

3 B. Cloning of cynomolgus monkey **AXL**

In the present study, the cynomolgus monkey AXL expression constructs pcDNA3-cyAXL was generated. The full length coding sequence of cynomolgus monkey AXL was PCR amplified using cDNA prepared from cynomolgus monkey brain tissue as template. Since the nucleotide sequence of cynomolgus monkey *AXL* was not available, respective primers were designed assuming significant homology to human *AXL*. The full length sequence coding for cynomolgus monkey AXL was thereby covered by two overlapping PCR fragments, a 5'-fragment and 3'-fragment. The primers for amplification of these fragments were as follows:

Forward primer CYNO1 for the 5'-fragment carrying an *Eco*RI recognition sequence:

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

Reverse primer CYNO2 for the 5'-fragment:

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

Forward primer CYNO3 for the 3'-fragment:

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

Reverse primer CYNO4 for the 3'-fragment carrying a *Not*I recognition sequence:

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

The 5'-fragment was digested with *Eco*RI and *Dra*III, the 3'-fragment was digested with *Dra*III and *Not*I, and pcDNA3 was cleaved with *Eco*RI and *Not*I. A three factor ligation of the isolated and purified fragments was performed and transformed into DH5α bacterial cells. A single colony was picked and grown in the presence of ampicillin. Using a commercially available plasmid purification kit (Qiagen), the cynomolgus monkey AXL expression vector pcDNA3-cyAXL was purified, and sequence verified for subsequent transient transfection into HEK293T cells. The nucleotide and amino acid sequences of cynomolgus monkey are as follows:

Nucleotide sequence:

ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTG
CTTGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCCAGGGGCACACAGG
CTGAAGAAAGTCCTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCC
GGGGACTCACGGGCACCCTTCGGTGTCAGCTCCAGGTTCAGGGAGAG
CCCCCCGAGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGC
GGACAGTACCCAGACCCAGGTGCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGA
CTGGATAGTGGTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCCGAC
GCGGGACAGTACCAGTGTTTGGTGTTTCTGGGACATCAGAACTTCGTGT
CCCAGCCTGGCTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGG
AGCCTGAGGACAGGACTGTGGCCGCCAACACCCCCTTCAACCTGAGCT
GCCAAGCCCAGGGACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAG
GATGCTGTCCCCCTGGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAAC
CTGCATGTTCCAGGGCTGAACAAGACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCC
ATAACGCCAAGGGAGTCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGC
TCCCCCAGCAGCCCCGTAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGG
AGCTGGAGGTGGCTTGGACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCCTGA
CCCACTGCACCCTGCAGGCTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCC
AGGCGGGAGAACCAGACCCCCCAGAGGAGCCCCTCACCTTGCAAGCAT
CTGTGCCCCCCCACCAGCTTCGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCC
CTTATCACATCCGTGTGGCATGCACCAGCAGCCAGGGCCCCTCATCCT
GGACACACTGGCTTCCTGTGGAGACGCCGGAGGGAGTGCCCCTGGGC
CCCCCTGAGAACATTAGTGCCACGCGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTG
CATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCCTGCAGGGTACCCTGTTAGGGTA
CCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACACCCCAGAGGTGCTAATGGACAT
AGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAGCTGCAGGGGGACGGGTCTG
TGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCTACACTGCTGCTGGGGATG
GACCCTGGAGCCTCCCAGTACCCCTGGAGGCCTGGCGCCCAGGGCAA
GCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAAACTTCAGCTCCTGCCTTC
TCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAGTCGTGGCCGCTGCC
TGTGTCCTCATCTTGGCTCTCTTCCTTGTCCACCGGCGAAAGAAGGAGA
CCCGTTATGGAGAAGTGTTCGAGCCAACAGTGGAAAGAGGTGAACTGG
TAGTCAGGTACCGCGTGCGCAAGTCCTACAGTCGCCGGACCACTGAAG

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

Amino acid sequence:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGAR
GLTGTLRCQLQVQGEPPEVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV
VSQLRIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRT
VAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNK
TSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLS
GIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHP
HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFV
HWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGSVSN

LTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPW
WYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRK
SYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG
QLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF
QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLHSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADI
ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYYRQG
RIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEI
YDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLK
ALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQLDPKDSCSCLTSA
EVHPAGRYVLCPSTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

3 C. Cloning of human Mer

In the present study, the human Mer expression construct pcDNA3-hMer was generated. The full length coding sequence of human Mer was obtained through cleavage of the vector pCMV6-XL4-human Mer (Origene #TC116132) with *Eco*RI and and *Xba*I. After digestion of pcDNA3 with the same restriction endonucleases, both fragments were ligated to generate pcDNA3-hMer. In order to introduce a Kozak consensus sequence, the 5'-region of the human Mer coding sequence in pcDNA3-hMer was PCR amplified using appropriate primers according to the NCBI reference sequence (NM_006343) of human Mer. The primers for amplification of this fragment were as follows:

Forward primer MER1 carrying an *Eco*RI recognition sequence and the Kozak consensus sequence:

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

Reverse primer MER2 for the 5'-fragment:

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

The PCR product and pcDNA3-hMer were digested with *Eco*RI and *Eco*RV and ligated to generate pcDNA3-Kozak-hMer, in which the full length human Mer coding sequence is preceded by a Kozak consensus sequence. Transformed into DH5α bacterial cells, a single colony was picked and grown in the presence of ampicillin. Using a commercially available plasmid purification kit (Qiagen), the pcDNA3-Kozak-hMer expression vector was

purified, and sequence verified for subsequent transient transfection into HEK293T cells.

3 D. Cloning of human Sky

In the present study, the human Sky expression construct pcDNA3-hSky was generated. The full length coding sequence of human Sky was PCR amplified using the vector pCMV6-XL4-human Sky (Origene #MG1044_A02) as template and appropriate primers according to the NCBI reference sequence (NM_006293) of human Sky. The primers for amplification were as follows:

Forward primer SKY1 carrying an *Eco*RI recognition sequence:
5'-CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC-3'
Reverse primer SKY2 carrying a *Xho*I recognition sequence:
5'-GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG-3'

The PCR product and pcDNA3 were digested with *Eco*RI and *Xho*I and ligated to generate the pcDNA3-hSky expression vector. Transformed into DH5α bacterial cells, a single colony was picked and grown in the presence of ampicillin. Using a commercially available plasmid purification kit (Qiagen), the pcDNA3-hSky expression vector was purified, and sequence verified for subsequent transient transfection into HEK293T cells.

3 E. Transfection and expression of mouse AXL, cynomolgus monkey AXL, human Mer, and human Sky

For transient expression of mouse AXL, cynomolgus monkey AXL, human Mer or human Sky, HEK293T cells were transiently transfected with either pcDNA3 empty vector, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer, or pcDNA3-hSky applying the calcium phosphate method. In brief, prior to transfection, $3x10^6$ HEK293T cells in 16 ml medium were seeded on a 15 cm cell tissue culture dish and grown at 7% CO_2 and 37°C for 30 h. 32 µg DNA of the respective expression construct or empty vector in 720 µl of ddH_2O were mixed with 2.5 M $CaCl_2$ and 2xBBS (pH 6.96) and kept at room temperature for 10 min. The solutions were gently added to the

cell cultures and incubated at 3% CO_2 and 37°C for 8 h. The medium then was replaced with fresh growth medium and cells were cultured at 7% CO_2 and 37°C for 24 h.

3 F. FACS analysis to test rat anti-AXL antibodies for cross-reactivity

For FACS analysis, $2x10^5$ cells were harvested with 10 mM EDTA in PBS, washed once with FACS buffer (PBS, 3% FCS, 0.4% azide) and seeded on a 96 well round bottom plate. To remove the supernatant, plates were spun for 3 min at 1000 rpm and cells were resuspended in 10 µg/ml isotypic control antibody 1D5 as well as anti-AXL 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 and 12B7 primary antibody solutions (100 µl/well). After incubation on ice for 1 h, cells were washed twice with chilled FACS buffer and resuspended with PE-conjugated donkey anti-rat (Jackson) secondary antibody diluted 1:50 in FACS buffer (100 µl/well) or PE-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody for control. Protected from light, cells were incubated on ice for 30 min, washed twice with FACS buffer and analyzed using an Epics XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter).

Figure 3 shows representative results of this experiment. With exception of 12B7 which shows moderate cross-reactivity with mouse AXL as well as human Mer and Sky, non of the other anti-AXL antibodies of the invention cross-reacted with these molecules. In contrast, all of the tested rat anti-AXL antibodies of the invention cross-reacted with cynomolgus monkey AXL.

Example 4. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced AXL phosphorylation *in vitro*

ELISA experiments were performed in order to investigate whether the rat anti-AXL antibodies of the invention are able to block ligand Gas6-mediated activation of AXL. Gas6-mediated AXL activation was detected by increased receptor tyrosine phosphorylation. In brief, on day 1, $3x10^4$ cells per well were seeded in normal growth medium in flat-bottom 96 well plates. The next day, growth medium was replaced by serum-free medium to starve cells

over night for 24 h. Also over night, black Maxi-Sorp 96 well plates (Nunc) were coated with mouse anti-phospho-tyrosine antibody 4G10 at 2 µg/ml PBS and 4°C. On day 3, the 4G10 antibody solution was removed and Maxi-Sorp wells were blocked with PBS, 0.5% BSA for at lest 4 h at room temperature. In parallel, cells were pre-incubated with 10 µg/ml of the mouse control antibody 72A1 as well as the rat anti-AXL antibodies 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7, and 10D12 for 1 h at 37°C and then treated with or without 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C. Medium was then flicked out and cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerine, and 1% Triton X-100) supplemented with phosphatase and protease inhibitors (10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM orthovanadate, 1 mM NaF, and 0,5% aprotinin) for 30 min on ice. Meanwhile, blocking buffer was removed and Maxi-Sorp plates were washed 6x with wash buffer (PBS, 0.05% Tween 20), before lysates were transferred and incubated over night at 4°C. After plates were washed 6x with wash buffer on day 4, wells were incubated with biotinylated rat anti-AXL antibody 12B7 at 0.5 µg/ml PBS for 2 h at room temperature. Plates were washed 6x with wash buffer and AP-conjugated streptavidin (Chemicon #SA110) diluted 1:4,000 in PBS was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, wells were washed 6x with wash buffer and AttoPhos substrate solution (Roche #11681982) was added. Using a Victor plate reader (Perkin Elmer), the fluorescence of each well was collected at an excitation wavelength of 430 nm and an emission wavelength of 580nm.

Figure 4 shows representative results of this experiment for NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts (A) and NCI-H292 lung cancer cells (B). The rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, and 10D12 of the invention were able to block or reduce ligand-mediated AXL activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 of the invention stimulate basal AXL activation as indicated by increased phosphorylation, do not significantly reduce ligand-mediated AXL activation, and are therefore

considered agonistic anti-AXL antibodies. Similar effects with the same panel of antibodies were observed in the lung cancer cell lines CaLu-1 and CaLu-6, the breast cancer cell lines Hs578T and MDA-MB-231, the prostate cancer cell line PC-3, the pancreas cancer cell line PANC-1, the melanoma cell line C-8161, the ovarian cancer cell lines SkOV-3 and SkOV-8, the glioblastoma cell line SF-126, the cervical cancer cell line CaSki, as well as the gastric cancer cell lines Hs746T and MKN-1.

Example 5. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced p42/p44 MAP-Kinase phosphorylation *in vitro*

Next, ELISA experiments were performed in order to investigate whether the rat anti-AXL antibodies of the invention are able to block ligand Gas6-mediated activation of p42/p44 MAP-Kinase. Gas6-mediated p42/p44 MAP-Kinase activation was detected by increased protein (Thr202/Tyr204) phosphorylation. In brief, on the first day, $2x10^4$ cells per well were seeded in flat-bottom 96 well plates. The next day, normal growth medium was replaced by serum-free medium to starve cells for 36 h. Thereafter, cells were pre-incubated with 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5 as well as the rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, and 2A1 for 1 hr at 37°C and then treated with or without 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C . Medium was flicked out and cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.5) for 30 min at room temperature. Formaldehyde solution was removed and cells were washed twice with wash buffer (PBS, 0.1% Tween 20). Cells were quenched with 1% H_2O_2, 0.1% NaN_3 in wash buffer and incubated for 20 min at room temperature. Afterwards, the quenching solution was removed, and cells were washed twice with wash buffer and blocked with PBS, 0.5% BSA for 4 h at 4°C. Anti-phospho-p42/p44 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) primary antibody (polyclonal rabbit; Cell Signaling #9101) diluted 1:500 in PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA was added over night at 4°C. On day 4, the antibody solution was removed and the plate was washed 3x with wash buffer. HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Dianova #111-036-045) diluted 1:2,500 in PBS, 0.5% BSA was then added

to each well and incubated for 1.5 h at room temperature. The plate was washed 3x with wash buffer and twice with PBS for 5 min each. Tetramethylbenzidine (TMB, Calbiochem) was added and monitored at 620 nm. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 250 nM HCl and the absorbance was read at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm using a Vmax plate reader (Thermo Lab Systems).

Figure 5 shows representative results of this experiment for the cervical cancer cell line CaSki. The rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 of the invention were able to reduce ligand-mediated p42/p44 MAP-Kinase activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibody 2A1 of the invention stimulates basal p42/p44 MAP-Kinase activation as indicated by increased phosphorylation, does not reduce ligand-mediated p42/p44 MAP-Kinase activation, and is therefore considered an agonistic anti-AXL antibody. Similar effects with the same panel of antibodies were observed in the breast cancer cell line Hs578T and the lung cancer cell line NCI-H292.

Example 6. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced Akt phosphorylation *in vitro*

Furthermore, ELISA experiments were performed in order to investigate whether the rat anti-AXL antibodies of the invention are able to block ligand Gas6-mediated activation of Akt-Kinase. Gas6-mediated Akt-Kinase activation was detected by increased protein (Ser473) phosphorylation. In brief, on day 1. $2x10^4$ cells per well were seeded in flat-bottom 96 well plates. The next day, normal growth medium was replaced by serum-reduced (DMEM, 0.5% FCS for NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts) or serum-free (for cancer cell lines) medium to starve cells for 36 h. Thereafter, cells were pre-incubated with 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5 as well as the rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, and 2A1 for 1 h at 37°C and then treated with or withour 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C.

Medium was flicked out and cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.5) for 30 min at room temperature. Formaldehyde solution was removed and cells were washed twice with wash buffer (PBS, 0.1% Tween 20). Cells were quenched with 1% H_2O_2, 0.1% NaN_3 in wash buffer and incubated for 20 min at room temperature. Afterwards, the quenching solution was removed, and cells were washed twice with wash buffer and blocked with PBS, 0.5% BSA for 4 h at 4°C. Anti-phospho-Akt (Ser473) primary antibody (polyclonal rabbit; Cell Signaling #9271) diluted 1:500 in PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA was added over night at 4°C. On day 4, the antibody solution was removed and the plate was washed 3x with wash buffer. HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Dianova #111-036-045) diluted 1:2,500 in PBS, 0.5% BSA was then added to each well and incubated for 1.5 h at room temperature. The plate was washed 3x with wash buffer and twice with PBS for 5 min each. Tetramethylbenzidine (TMB, Calbiochem) was added and monitored at 620 nm. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 250 nM HCl and the absorbance was read at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm using a Vmax plate reader (Thermo Lab Systems).

Figure 6 shows representative results of this experiment for NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts (A) and CaLa-1 lung cancer cells (B). The rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 of the invention were able to block or reduce ligand-mediated Akt-Kinase activation as indicated by decreased phosphorylation, and are thus considered antagonistic anti-AXL antibodies. In contrast, the rat anti-AXL antibody 2A1 of the invention stimulates basal Akt-Kinase activation as indicated by increased phosphorylation, does not reduce ligand-mediated Akt-Kinase activation, and is therefore considered an agonistic anti-AXL antibody. Similar effects with the same panel of antibodies were observed in the lung cancer cell line NCI-H292, the breast cancer cell lines Hs578T and MDA-MB-231, the prostate cancer cell line PC-3, the pancreas cancer cell line PANC-1, the melanoma cell line C-8161, the ovarian cancer cell lines SkOV-3 and SkOV-8, the bladder cancer cell line TCC-Sup, as well as the fibrosarcoma cell line HT1080.

Example 7. Rat and chimeric anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced Akt phosphorylation *in vitro* to similar extent

Chimeric derivatives of the rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 were generated as part of this invention (see below). In order to investigate whether the rat anti-AXL antibodies of the invention and the corresponding chimeric anti-AXL antibodies of the invention were able to block ligand Gas6-mediated activation of the Akt-Kinase in NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts to similar extent, ELISA experiments were performed. Antibody-mediated Akt-Kinase inhibition was detected by decreased protein (Ser473) phosphorylation. In brief, on day 1. $2x10^4$ cells per well were seeded in flat-bottom 96 well plates. The next day, normal growth medium was replaced by serum-reduced medium (DMEM, 0.5% FCS) to starve cells for 36 h. Thereafter, cells were pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, and 1 µg/ml of rat anti-AXL antibody 11B7 or chimeric anti-AXL antibody ch11B7, as well as 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-AXL antibody 11D5 or chimeric anti-AXL antibody ch11D5 for 1 h at 37°C and then treated with or without 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C. Medium was flicked out and cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.5) for 30 min at room temperature. Formaldehyde solution was removed and cells were washed twice with wash buffer (PBS, 0.1% Tween 20). Cells were quenched with 1% H_2O_2, 0.1% NaN_3 in wash buffer and incubated for 20 min at room temperature. Afterwards, the quenching solution was removed, and cells were washed twice with wash buffer and blocked with PBS, 0.5% BSA for 4 h at 4°C. Anti-phospho-Akt (Ser473) primary antibody (polyclonal rabbit; Cell Signaling #9271) diluted 1:500 in PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA was added over night at 4°C. On day 4, the antibody solution was removed and the plate was washed 3x with wash buffer. HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Dianova #111-036-045) diluted 1:2,500 in PBS, 0.5% BSA was then added to each well and incubated for 1.5 h at room temperature. The plate was washed 3x with wash buffer and twice with PBS for 5 min each. Tetramethylbenzidine (TMB, Calbiochem) was added and

monitored at 620 nm. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 250 nM HCl and the absorbance was read at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm using a Vmax plate reader (Thermo Lab Systems).

Figure 7 demonstrated that rat anti-AXL antibody 11B7 and chimeric anti-AXL antibody ch11B7 of the invention as well as rat anti-AXL antibody 11D5 and chimeric anti-AXL antibody ch11D5 of the invention were able to inhibit ligand-mediated Akt-Kinase activation to similar extent as indicated by decreased phosphorylation. Thus, as compared to their respective rat counterparts, the chimeric anti-AXL antibodies ch11B7 and ch11D5 maintained activity.

Example 8. Antagonistic rat-anti AXL antibodies of the invention compete with each other for the same or structurally related epitopes and do not share binding sites with agonistic rat-anti AXL antibodies of the invention

Anti-AXL antibodies of the invention were examined whether they compete with each other for similar binding epitopes on the AXL-ECD domain. Therefore binding of biotinylated anti-AXL antibodies to AXL-ECD domain-coated plates preincubated with anti-AXL antibodies was determined in a competition ELISA. In brief, 30 µg of isotypic control antibody 1D5 as well as rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, and 2A1 were biotinylated with Sulfo-NHS-Biotin (Pierce #21217) according to the manufacturers' instructions and purified utilizing Micro-BioSpin P6 columns SSC (BIO-RAD #732-6200). On day 1, black 96 well Maxi-Sorp plates (Nunc) were coated with 100 µl/well of 1 µg/ml human AXL-ECD (R&D Systems #154-AL) in PBS over night at 4°C. On day 2, coated Maxi-Sorp plates were blocked with blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% TWEEN-20) for 2 h at room temperature (250 µl/well), and subsequently incubated with PBS or unbiotinylated isotypic control antibody 1D5 as well as unbiotinylated rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, or 2A1 at 10 µg/ml in blocking buffer (100 µl/well) for 1 h at room temperature. Antibody

solutions were flicked out without washing and 100 µl/well PBS or biotinylated isotypic control antibody 1D5 as well as biotinylated rat anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, or 2A1 at 0.5 µg/ml in blocking buffer were added and incubated for 15 min at room temperature. After washing 6x with wash buffer (PBS, 0,1% TWEEN-20), 80 µl/well AP-conjugated Streptavidin (Chemicon #SA110) diluted 1:4,000 in blocking buffer were added, incubated for 20 min at room temperature washed again 6x with wash buffer and finally washed once with PBS. For detection, 100 µl/well Attophos substrate solution (Roche # 11681982) were added. Using a Victor plate reader (Perkin Elmer), the fluorescence of each well was collected at an excitation wavelength of 430 nm an emission wavelength of 580 nm.

Figure 8 shows representative results of this analysis. The antagonistic anti-AXL antibodies 11B7, 11D5, 6E7, and 10D12 of the invention compete with each other for the same or structurally adjacent epitopes. The two agonistic antibodies 11D7 and 2A1 of the invention recognize individually different epitopes and therefore are not mutually exclusive. Moreover, 11D7 and 2A1 do not compete with the antagonistic antibodies for binding to the AXL-ECD. The control antibody 1D5 did not bind to AXL-ECD.

Example 9. Rat and chimeric anti-AXL antibodies of the invention inhibit lung cancer cell migration and proliferation *in vitro*

To examine the migration and proliferation rates of different cells and culture conditions, *in vitro* wound healing/scratch assays are being employed for many years. These assays generally involve growing a confluent cell monolayer first. A small area is then disrupted and a group of cells are being destroyed or displaced by scratching a line through the layer with, for example, a pipette tip. The open gap is then inspected microscopically over time as the cells move in and fill the damaged area ("healing"). In brief, $1.5x10^6$ NCI-H292 lung cancer cells were seeded per well of a 12 well dish and cultured in normal growth medium (RPMI, 10% FCS). After 8 h, cells

were rinsed with PBS and starved in low serum medium (RPMI, 0.5% FCS) over night for 24 h. Using a sterile 200 µl pipette tip, three separate uniform wounds per well were scratched through the confluent NCI-H292 cell monolayers. Cells were gently rinsed with PBS and incubated with low serum medium (RPMI, 0.5% FCS) containing no additive, 10 µg/ml of the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, 6E7, or 10D12, the chimeric anti-AXL antibodies chn11D5 IgG2 and chn11B7 IgG2, the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 as well as 10 µg/ml of Erbitux or 5µM Sutent for comparison. Cells were permitted to migrate into the area of clearing for 24 h, washed once with PBS and fixed with ice cold Methanol (100%) at -20°C. After cells were stained with crystal violet (0.5% in 20% Methanol), rinsed with water and dried over night, photos of the wounds were taken.

Figure 9 shows representative results of this experiment for NCI-H292 lung caner cells. Compared to the isotypic control antibody, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11D5, 11B7, 6E7, and 10D12 of the invention, as well as the chimeric anti-AXL antibodies chn11D5 IgG2 and chn11B7 IgG2 of the invention reduced the re-population of the cleared area, whereas the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 of the invention led to a complete closure of the wound. Similar results with the same panel of antibodies were observed with the ovarian cancer cell line SkOv-3 or the gastric cancer cell line MKN-1.

Example 10. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced migration of NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts *in vitro*

Transmigration experiments were performed in order to investigate whether the antibodies of the invention block cell migration. For this purpose, in the morning of day 1, NIH3T3-AXL cl.7 cells were seeded on 15 cm dished in normal growth medium, which in the evening was replaced by serum-reduced medium (DMEM, 0.5% FCS) in order to starve cells for 36 h. The next day, a FluoroBlock 96 well plate (Becton Dickinson #351164, 8 µm pore

size) was coated with 10 µg collagen I/ml 0.1 M acetic acid over night at 37°C. On day 3, the serum-reduced medium (DMEM, 0.5% FCS) was replaced by serum-free medium (DMEM, 0% FCS, 0.1% BSA) for another 4 h. Cells were harvested with 10 mM EDTA in PBS and pre-incubated with rat anti-AXL antibodies 4A6, 11B7 or 2A1 at a cell density of $4x10^5$ cells/ml and an antibody concentration of 10 µg/ml for 45 min. 50 µl cell suspension (20,000 cells) per well were then placed in the top chamber of the FluoroBlock 96-well plate, 225 µl medium (DMEM, 0%FCS, 0.1%BSA) with or without 400 ng/ml mouse Gas6 (R&D Systems) were used per well in the bottom chamber. Cells were left to migrate for 7 h at 37°C and stained afterwards with 4.2 µM calcein-AM (Molecular Probes #C3099) in PBS, 1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ for 1 h at 37°C. Using a Victor plate reader (Perkin Elmer), the fluorescence of each well was measured at a wavelength of 530 nm.

Figure 10 shows that the antagonistic anti-AXL antibody 11B7 of the invention reduced both basal and Gas6-induced migration of NIH3T3-AXL cl. 7 fibroblasts, whereas the agonistic rat anti-AXL antibody 2A1 of the invention increased ligand-induced and, in particular, basal migration of NIH3T3-AXL cl.7 cells. The antibody 4A6 did not affect cell migration.

Example 11. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-induced proliferation of NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts *in vitro*

In vitro experiments were conducted in order to determine the ability of the rat anti-AXL antibodies of the invention to inhibit Gas6-induced cell proliferation. For this purpose, 2,500 NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts per well were seeded in FCS-containing medium on 96 well plates over night. The next day, cells were starved in serum-reduced medium (DMEM, 0.5% FCS) for 10 h and subsequently pre-incubated with 20 µg/ml of the mouse control antibody 72A1, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11D5 and 11B7, as well as the agonistic antibody 2A1 in DMEM, 0.5% FCS for 1 h at 37°C. Cells were treated with or without 400 ng/ml mouse Gas6 (R&D Systems) by adding ligand directly to the antibody solution, and were then left to grow for

96 h. AlamarBlue™ (BIOSOURCE #DAL1100) was added and incubated at 37°C in the dark. Absorbance was measured at 590 nm every 30 min. The data were taken 4 h after addition of AlamarBlue™.

Figure 11 shows representative results of this experiment. The antagonistic anti-AXL antibodies 11D5 amd 11B7 of the invention blocked Gas6-induced proliferation of NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, whereas the agonistic rat anti-AXL antibody 2A1 of the invention increased ligand-induced and, in particular, basal proliferation of NIH3T3-AXL cl.7 cells.

Example 12. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit ligand-mediated anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts *in vitro*

Induction of apoptosis and activation of caspases can result from a variety of stimuli including growth factor withdrawal, exposure to chemotherapeutic agents or radiation, or initiation of the Fas/Apo-1 receptor-mediated cell death process. Gas6-AXL interaction has been shown to be implicated in the protection of a range of cell types from apoptosis, including serum-starved NIH3T3 fibroblasts (Goruppi et al., 1996, Oncogene 12, 471-480) or pulmonary endothelial cells (Healy et al., 2001, Am. J. Physiol., 280, 1273-1281). In the present example we examined whether rat anti-AXL antibodies of the invention interfere with Gas6-mediated anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, and thus induce apoptosis. Apoptosis rates were thereby determined by measurement of the cellular caspase-3/7 activity. For this purpose, NIH3T3-AXL cl.7 cells were seeded at a density of $1.5x10^3$ cells per well in black clear-bottom 96 well plates (100 µl/well). The day after, normal growth medium was replaced by serum-reduced medium (DMEM, 0.5% FCS) to starve cells over night for 24 h. The next day, antibody solutions of the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5, as well as the agonistic rat anti-AXL antibodies 11D7 and 2A1 at 80 µg/ml in DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA were prepared. The cells were washed with PBS, covered with 60 µl of

DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA, and 10µl of the respective antibody solution were added. After 1 h incubation at 37°C, 10 µl of DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA with or without 3.2 µg/ml mouse Gas6 (R&D Systems) were added (the final concentrations of antibody and Gas6 were 10 µg/ml and 400 ng/ml, respectively), and cells were incubated at 37°C for another 5 h. The following steps refer to the technical bulletin to the Apo-ONE Homogenwous Caspase-3/7 Assay (Promega, G7791). In brief, culture plates were removed from the incubator and allowed to equilibrate at room temperature for 20 min. 60 µl of Apo-ONE substrate and 6 ml buffer were thawed, combined, and added to the samples (75 µl/well). The contents of wells was gently shaken for 30 sec, and, protected from light, incubated at room temperature for 1 h. Using a Victor plate reader (Perkin Elmer), the fluorescence of each well was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530nm.

Figure 12 shows representative results of this experiment. Compared to the isotypic control antibody, the antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 of the invention reduced Gas6-mediated anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 fibroblasts, and thus induced apoptosis. In contrast, the agonistic rat anti-AXL antibodies 2A1 and 11D7 of the invention strongly induced anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-AXL cl.7 cells regardless of the absence or presence of Gas6, and therefore inhibited apoptosis.

Example 13. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit spheroid-based cellular angiogenesis *in vitro*

AXL is a key regulator of multiple angiogenic behaviors including endothelial cell migration, proliferation, and tube formation *in vitro* (Holland et al., Cancer Res: 65, 9294-9303, 2005). Therefore, the rat anti-AXL monoclonal antibodies 11B7 and 11D5 of the invention were tested for inhibitory effects on VEGF-A–induced vessel sprouting of HUVEC-spheroids. The experiments were pursued in modification of the originally published protocol

(Korff and Augustin: J Cell Sci 112: 3249-58, 1999). In brief, spheroids were prepared as described (Korff and Augustin: J Cell Biol 143: 1341-52, 1998) by pipetting 500 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in a hanging drop on plastic dishes to allow over night spheroid aggregation. 50 HUVEC spheroids were then seeded in 0.9 ml of a collagen solution (2 mg/ml) and pipetted into individual wells of a 24 well plate to allow polymerization. Decreasing concentrations of the rat anti-AXL antibodies 11B7 and 11D5 ($1x10^{-6}$ M, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-8}$ M, 1x10-9 M, $1x10^{-10}$ M) were directly mixed in the collagen solution before polymerization, whereas the growth factor VEGF-A (final concentration 25 ng/ml) was added after 30 min by pipetting 100 µl of a 10-fold concentrated working dilution on top of the polymerized gel. Plates were incubated at 37°C for 24 hours and fixed by adding 4% paraformaldehyde. Sprouting intensity of HUVEC spheroids was quantified by an image analysis system that determines the cumulative sprout length per spheroid using an inverted microscope and the digital imaging software Analysis 3.2 (Soft imaging system, Münster, Germany). The mean of the cumulative sprout length of 10 randomly selected spheroids was analyzed as an individual data point.

Figure 13 shows the results of this experiment. The antagonistic rat anti-AXL antibodies 11B7 (A) and 11D5 (B) of the invention inhibited VEGF-A-stimulated HUVEC sprouting in the spheroid-based angiogenesis assay in a dose-dependent manner. Whereas treatment with the highest concentration of 11B7 reduced HUVEC sprouting to basal levels, inhibition with the highest concentration of 11D5 was not as effective (left panel). HUVEC sprouting was inhibited with IC_{50} values of 9.8×10^{-8} M and 7.0×10^{-7} M for 11B7 and 11D5, respectively (right panel).

Example 14. Rat anti-AXL antibodies of the invention reduce human prostate carcinoma growth in nude mice

The anti-tumor efficacy of therapeutic antibodies is often evaluated in human xenograft tumor studies. In these model systems, human tumors grow as xenografts in immunocompromised mice and therapeutic efficacy is

measured by the degree of tumor growth inhibition. The aim of this study was to evaluate whether the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 of the invention interferes with tumor growth of human prostate cancer cells in nude mice. In brief, on day 0, 7-8 weeks old male NMRI$^{nu/nu}$ mice (approximate weight: 30 g after acclimatization) were anesthesized with 1.5-2.0 volume percent isoflurane at an oxygen flow rate of 2 l/min, and $1x10^6$ PC-3-LN cells in 25 µl PBS were orthotopically implanted into the prostate. PC-3-LN cells are derived from the PC-3 prostate carcinoma cell line which was infected with a retrovirus coding for a luciferase-neomycin fusion protein. The onset of tumor growth and tumor growth progression was therefore measurable via *in vivo* bioluminescence imaging. For this purpose, luciferin was injected intraperitoneally (i.p.) into the mice and light emission was measured 10 min post injection using a NightOWL LB 981 bioluminescence imaging system (Berthold Technologies, Germany). Prior to first treatment, mice were randomized and statistical tests performed to assure uniformity in starting tumor volumes (mean, median and standard deviation) across the treatment groups of 10 animals each. On day 8, all treatments started and were continued until day 34, followed by necropsy on day 35. 25 mg/kg of the isotypic control antibody 1D5 and the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 were intraperitoneally (i.p.) administered 3x a week (Mo, Wed, Fr) into animals of group 1 and 2, respectively. Animals of group 3 orally (p.o.) received 40 mg/kg of Sutent once a day. Animals of Group 4 received three intraveneous (i.v.) injections with 12.5 mg/kg of Taxotere 4 days apart of each other. An overview of the treatment groups is given below.

Group		Treatment	Application		Animal Number
			Route	Scheme	
1	1D5	25 mg/kg	i.p.	3 times per week (Mo, Wed, Fr) starting one day after randomization[2)]	10
2	11B7	25 mg/kg	i.p.	3 times per week (Mo, Wed, Fr) starting one day after randomization[2)]	10
5	Sutent	40 mg/kg	p.o.	**daily** starting one day after randomization[2)]	10
6	Taxotere	12.5 mg/kg	i.v.	**3 doses 4 days apart** starting one day after randomization	10

Figure 14 shows the results of this experiment. Compared to the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 of the invention reduced the overall growth of PC-3-LN prostate tumors in nude mice.

Example 15. Rat anti-AXL antibodies of the invention inhibit metastasis of human prostate carcinoma

In the same experiment as described under "Rat anti-AXL antibodies of the invention reduce human prostate carcinoma growth in nude mice", relocalization of PC-3-LN tumor cells into other organs (metastasis) was analyzed post necropsy to evaluate anti-metastatic effects of the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 of the invention..For this purpose, selected organs (liver, spleen, lungs, femur, part of the lumbar spine) were collected post necropsy, homogenized, and supplemented with luciferin. Subsequently, light emission was measured using a NightOWL LB 981 bioluminescence imaging system (Berthold Technologies, Germany).

Figure 15 shows the results of this experiment for the analysis of spleens. Compared to the isotypic control antibody 1D5, the antagonistic rat anti-AXL antibody 11B7 of the invention reduced the occurrence of spleen metastases. Noteworthy, the anti-metastatic effect of 11B7 in this experiment was stronger than that of Sutent. Similar observations were obtained for liver, lung, femur, and lumbar spine metastasis.

Example 16. AXL is predominantly expressed in tumor rather than adjacent normal tissue

In this study, the AXL expression in 17 different human malignancies was immunohistochemically analysed on formalin-fixed paraffin-embedded tissues in tissue multiarray format. For each tumor type, pairs of tumor tissue and matching non-malignant tissue were examined. In brief, tissue was fixed for 16 to 20 h in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. For

construction of a 60-core tissue microarray (TMA), one punch of healthy tissue and one punch of corresponding tumor tissue of each case was chosen by a pathologist. A 96-core TMA with normal control tissue punches (three of each tissue type) was generated regarding to FDA guidelines. Each punch was 1.5 mm in diameter.

With a microtome, 2-4 µm sections of selected tissue blocks were cut, mounted on silanized glass slides (Sigma) and dried at 60°C for 30 min and 38°C over night. Sections were deparaffinized by incubation in a xylene bath for 5 min twice, in acetone for 5 min twice and finally in distilled water for 5 min. Heat pre-treatment of the sections was performed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 in a steamer for 30 min, followed by washing in distilled water. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with a freshly prepared solution of 0.3% H_2O_2 in methanol for 20 min at room temperature, followed by washing with distilled water and PBS for 5 min each. Sections were incubated with polyclonal goat anti-human AXL antibody (Santa Cruz SC-1096) for 60 min (1:20 dilution in TBST) at room temperature. After three washes in TBST, the sections were incubated with biotinylated rabbit anti-goat secondary antibody (Dianova, 1:200 dilution in TBST) for 45 min at room temperature. After washing as before, the sections were incubated with Streptavidin/HRP (DAKO, 1:300 dilution in TBST) for 30 min at room temperature, followed by washing as before. Staining was achieved with DAB solution (DAKO; 1:50 dilution in substrate buffer) for 10 min at room temperature. Finally, the slides were rinsed with water, counterstained with Harris' hematoxylin, and covered with a glass slide. Control sections were incubated with goat IgG control antibody (R&D) instead of anti-AXL primary antibody.

Figure 16 summarizes the results of this analysis on AXL expression in 17 different human solid tumors and corresponding non-malignant tissue (A). Among all cases screened for each indication, no marked expression was detected in follicular lymphoma, prostate cancer (except for single cells), and in kidney cancer. Melanoma and Merkel cell tumors showed very low

expression of AXL. A weak expression was observed in a few tumors of the lung, mainly adenocarcinomas. Esophagus and Barrett tumors, ovarian, colon and pancreatic tumors as well as liver tumors (hepatocellular carcinoma) showed weak staining in about 30% of the cases. Head and neck tumors showed weak to moderate staining in about 40% of the tumors. Weak to moderate staining was detected in 60% to 100% of the analyzed tumors of the breast, cervix, bladder, thyroid and the stomach. Most intense staining was seen in mammary tumors and in a signet ring cell carcinoma of the stomach (B). Non-malignant tissues mainly showed no specific staining except from tubuli of the kidney which sometimes showed weak staining over background.

Example 17: Structure and characteristics of anti-AXL antibodies

17 A. Nucleotide sequences of rat antibody variable domains

Rat anti-AXL antibody variable domains were cloned from hybridoma cells. RNA was prepared utilizing the RNA-Extraction kit RNeasy (RNeasy midi-kit, Qiagen). cDNA encoding for the antibody genes was prepared using the 5 ´RACE kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Briefly, first strand cDNA was synthesized from total or RNA using the gene-specific GSP1-primers and SuperScript™ II Reverse Transcriptase. After first strand cDNA synthesis, the original mRNA template is removed by treatment with the RNase Mix. A homopolymeric tail is then added to the 3'-end of the cDNA. PCR amplification is accomplished using *Taq* DNA polymerase, a nested, gene-specific primer (GSP2) that anneals to a site located within the cDNA molecule and an anchor primer provided with the kit. Following amplification 5' RACE products were cloned into the pLXSN-ESK vector for sequencing. To facilitate cloning the Anchor Primer (AP) included a recognition sequence for *Sal* I, GSP2 primers contained a XhoI site.

GSP1 primer:

kappa_GSP1: GATGGATGCATTGGTGCAGC
new_kappa_GSP1: ATAGATACAGTTGGTGCAGC
heavy_GSP1: CAGGGTCACCATGGAGTTA

GSP2 primer:

XhoI-hGSP2: CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG
XhoI-kGSP2: CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

Utilization of GSP primers for rat anti-AXL Mab cloning:

11B7: kappa GSP1; XhoI-kGSP2
heavy GSP1; XhoI-hGSP2

10D12: kappa_GSP1, new_kappa_GSP1; XhoI-kGSP2
heavy GSP1; XhoI-hGSP2

11D5: new_kappa_GSP1; XhoI-kGSP2
heavy GSP1; XhoI-hGSP2

17 B. Aminoacid sequence rat anti-AXL antibody variable domains

Rat antibody variable domain sequences were translated from sequenced genes cloned into the pLXSN-ESK vectors. The given amino acid sequences start at position one of the variable domain. The complementarity determining regions (CDRs) required for the specific binding of the antibody to its target are defined according to Kabat (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991). The Kabat definition is based on the sequence variability

within the variable domains. Anti-AXL specific CDR regions of the antibodies are listed in SEQ ID NO: 13-30. The individual CDRs include the following positions:

CDR-L1: 24-34
CDR-L2: 50-56
CDR-L3: 89-97

CDR-H1: 31-35b
CDR-H2: 50-65
CDR-H3: 95-102

17 C Rat antibody expression and purification:

Hybridomas were cultured in Celline CL 1000 bioreactors (Integra Biosciences) at 37°C, 5-7% CO_2 using DMEM including 4.5g/L glucose; 1% Glutamine, 1% Pyruvate 1% Pen/Strep. FCS supplementation is 1 % FCS for the nutrient compartment and 5 % low IgG FCS for the cell compartment. Harvest and media exchange is performed twice a week. Cell splitting 1/1 ->1/3 depending on cell growth. Productivity is tested once a week via SDS-PAGE analysis. Supernatants are stored at –20°C until purification. Mycoplasma test of running cultures is done once a week.

Antibodies are purified using Protein A or G Sepharose FF (GE-Healthcare) via an Äkta Explorer 100 System (GE-Healthcare). Columns are individually packed for each purification. The column size is adjusted to the expected productivity and size of each batch (usually 50 – 500 mg). Protein containing solutions are kept on ice or at 4°C wherever possible. Sterile buffers and double destilled water are used for the entire process.

Supernatants are thawed, buffered with 50 mM TRIS pH 8.5, centrifuged, filtered through a 0.22 µm membrane and loaded onto the column. After

washing with 8 column volumes (CV) 50 mM PO_4, pH8.5 the antibody is eluted within 10 CV 100 mM Glycin, pH 3.3. Eluate fractions are rebuffered immediately to neutral pH by adding 1/5 1M Tris pH 8.0 (1 ml Tris per 4ml eluate fraction) and analysed by rSDS-PAGE subsequently. Fractions containing pure antibody are pooled, dialysed against PBS at 4°C and sterile filtered.

Buffer system requirements are adjusted according to the individual properties of each antibody. In particular, rat IgG2a antibody 11D5 was bound to ProteinG 4 FF matrix (GE-Healthcare) and washed under high salt conditions (2M NaCl). Rat antibody IgG1 11B7 was purified via rProteinA (GE-Healthcare) under high salt conditions according to 11D5. Antibody elution was performed at pH 5.5. Flow rate for rat antibody purification has to be kept low for increased binding efficiency.

As a second purification step either ion exchange chromatography (under individual, suitable conditions) or preparative size exclusion chromatography (PBS, pH 7.4) can be implemented.

The standard protocol for quality control of the purified antibodies includes:

- rSDS-PAGE gel analysis; Coommassie or silver stained
- BCA test (Pierce #23227 BCA Protein Assay Kit; rat IgG standard #31233)
- Analytical size exclusion (Superdex 200 Tricorn 10/300 GL,~250 mg in 250 µl; 0.5 ml/min, Äkta Explorer 100)
- Endotoxin test (LAL, Cambrex QCL-1000® Chromogenic LAL Endpoint Assay # US50-648U)
- Cell based activity assays (FACS binding; pAkt; pAXL)

Purified antibodies are stored in PBS, pH 7.4 under steril conditions at 4°C or –20°C depending on their stability.

17 D. Antibody Affinity determination by FACS scatchard

Human AXL overexpression NIH3T3 cells were harvested by incubation with 10 mM EDTA in PBS and resuspended at 6 million cells per ml in FACS buffer (PBS pH 7.4, 3% FCS, 0.1% NaN_3). In a round-bottom microtiter plate, 100 µl of cell suspension were added to 100µl of antibody solution containing antibodies 11B7, 11D5, ch11B7-IgG2 or ch11D5-IgG2 at concentrations between 40 and 0.002 µg/ml (266 and 0.01 nM) in FACS buffer. Antibody binding was allowed to proceed for 2 hours on ice. Then, cells were washed twice with 250 µl FACS buffer per well, and resuspended in 200µl of secondary antibody (anti-rat-PE; Jackson) diluted 1:50 in FACS buffer. After 45 minutes of incubation, cells were again washed twice in FACS buffer and resuspended in 500ml PBS for FACS analysis. Analysis was carried out on a Beckman-Coulter FACS FC500. To determine the apparent affinity constant K_{Dapp}, mean fluorescence values were plotted against the ratio of mean fluorescence and the corresponding antibody concentration ([M]). The calculated K_{Dapp} resulted from the inverse slope of the straight line are listed below:

Clone	K_D value (nM)
11B7	0.38
ch11B7-IgG2	0.6
11D5	0.81
Ch11D5-IgG2	0.9

18. Chimerization of rat anti-AXL antibodies:

Human kappa light chain and heavy chain IgG1/2 genes were cloned from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a human volunteer as described below:

PBMCs were prepared from whole blood. Blood was diluted 1/2,5 in

PBS/ 2 mM EDTA with 10 U/ml heparin at RT, layered over 15 ml Biocoll solution covered by a diaphragm (35 ml/ tube) [Biocoll from Biochrom # L6115]. Samples were centrifuged at RT for 30 min at 400xg and serum (~ 15 ml) was discarded. Interface containing PBMCs was carefully recovered using a Pasteur pipette. PBMCs were washed 2x in PBS/2 mM EDTA (first wash 100ml, second wash 50 ml) and spun down at 300xg for 10 min. Cell pellet was resuspended in RPMI/ 10% FCS (25 ml) and yielded $5.5x10^7$ PBMCs.

RNA was prepared from PBMCs using RNeasy kit from Qiagen (# 75142) according to manufacturer's instructions. Purified RNA (30 µg) was stored in aliquots at –80°C.

cDNA for antibody IgG gamma 1 and 2 as well as kappa chains were prepared from isolated RNA by RT-PCR using Superskript III Reverse Transkriptase (invitrogen # 18080 – 93) according to manufacturers instructions using the following primers:

1) RT-gamma: GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG

2) RT-gamma2: GGG CTT GCC GGC CGT G

3) RT-kappa: TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG

4) 5´Blp: AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT

5) 3´Bam(GAG): AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G

6) 5´Bsi: AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT

7) 3´Bam(CTT): AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT

Primers were dissolved at 100µM. RT-PCR reactions were performed using 2pmol oligo RTγand RTκ respectively, adding 1 µg RNA, 10 mM dNTP mix and heat for 5 min to 65 °C. 4µl first strand buffer, 1µl 0.1M DTT, 1 µl RNase inhibitor (40 U/µl Fermentas # EO0311) and 2 µl Superscript III RT were added, mixed and incubated at 50°C for 1h followed by a heat inactivation step for 15 min at 70 °C.

2µl of first strand reaction were used for second step PCR using Taq polymerase (Eurochrom # EME010001) to yield double stranded DNA of antibody constant domains. The primer 5´Blp and 3´Bam(GAG) were used to amplify γ–chain, and 5´Bsi and 3´Bam(CTT) were used to amplify κ-chain constant regions using the following PCR settings:.

κ-chain amplification:

94°C	120 sec
94°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	45 sec cycle 35 times
72°C	10 min

γ–chain amplification:

94°C	120 sec
94°C	30 sec
45°C	30 sec
72°C	60 sec cycle 5 times

94°C 30 sec
50°C 30 sec
72°C 60 sec cycle 35 times

72°C 10 min

The PCR products were analysed on a TAE buffered 2% agarose gel. A single band of ~350 bp for kappa light chain and a single band of ~ 1000 bp for the heavy chains γ1 and γ2 were found. The PCR products were purified by Qiagen gel extraction kit, (QIAGEN, #28784) according to the manufacturer's instructions. To clone the PCR fragments into the multiple cloning site of the pcDNA3 vector (Invitrogen), pcDNA3 vector and PCR fragments were digested with HindIII (5´) and BamHI (3´) restriction endonucleases. Restriction sites were encoded within the PCR primers. Digested fragments were purified using the Qiagen PCR purification kit (QIAGEN, 28104), and DNA encoding the γ1, γ2 and κ chains were ligated into the pcDNA3 vector facilitating T4 DNA ligase at 16°C overnight. Ligase was inactivated for 10 min. at 65°C. Ligated DNA plasmids were directly transformed into $CaCl_2$ competent *E.coli* using standard protocol and plated onto Ampicillin containing LB-plates. After incubation at 37°C overnight single colonies were picked, suspended in 10 µl H_2O and proofed for containing the respective antibody chain carrying plasmid by PCR (5 µl suspended cells, Taq polymerase, primer 5Blp and 3Bam(GAG) γ1/γ2 and 5Bsi and 3Bam(CTT) for κ colonies:

94°C 120 sec

94°C 30 sec
55°C 30 sec
72°C 60 sec cycle 35 times

72°C 10 min

Samples were analysed on 1.5% agarose gel for PCR products. Antibody gene containing colonies were selected to inoculate 5 ml LB/Ampicillin medium. After incubation at 37 °C overnight *E.coli* were harvested and DNA was prepared using Qiagen miniprep kit (QIAGEN, # 12123). A control digest (HindIII, BamHI) showed all κ and γ chain gene inserts at the expected size; sequences were verified by DNA sequencing at Medigenomix.

Rat variable domains were amplified by PCR from pLXSN-ESK vector and cloned into g1/g2 and k pcDNA3 vectors to yield the chimeric full length antibodies. Variable VL domains were amplified with the following primers, containing a HindIII and BsmI site at the 5´end and a BsiWI site at the 3´end:

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

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

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

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

Variable VH domains were amplified with the following primers, containing a HindIII and BsmI site at the 5´end and a BlpI site at the 3´end:

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

VH-11B7/11D5-3´: AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC

TCC TTG GCC

BsiWI for the light chain and the BlpI for the heavy chain are single sites at the 5´end of the constant regions to enable the direct fusion with the 3´end of the variable domain genes.

Fused to the leader sequence SEQ ID No.: 69 derived from pLNOH2 vector (Norderhaug et. al. J. Immunol. Methods 204, 1997; Neuberger EMBO J. 1983; 2 (8): 1373-8,1983) genes encoding the chimeric antibody chains were cloned into pCEP vector system for recombinant expression. Light chain genes were cloned NheI (5´) and XhoI (3`) into pCEP4 (Invitrogen) heavy chain genes KpnI (5´) and XhoI (3`) into pCEP-Pu (Kohfeld FEBS Vol 414; (3) 557ff, 1997).

HEK 293 cells seeded on 20x20 cm plates were co-transfected with 1µg/ml of each plasmid coding for light and heavy chain genes using standard $CaPO_4$ transfection method for transient expression. Culture conditions were 37°C, 5% CO_2 in DMEM/F12 high glucose medium containing 5% low IgG FCS, 1% pyrovate, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin. 24h after transfection medium was exchanged by fresh medium. Supernatants were collected every 2-3 days for approximately 3 weeks. Chimeric antibodies were purified from approximatelly 600ml supernatant utilizing 1 ml Hitrap rProtein A columns (GE-Healthcare) under standard buffer conditions (loading: 50 mM Tris; pH=8.5, wash: 50mM PO_4; pH= 8.5, elution: 100mM Glycin; pH 3,3) as described for rat antibody purification.

Example 19. Humanization of rat anti-AXL antibody variable domains

The rat variable regions of the chimeric antibodies were compared to human antibody germline sequences at the protein level via a BLAST search for immunoglobulin domains The closest human counterpart within the V-genes, which in addition had identical CDR loop lengths was identified. The associated D and J segments were selected from the V-

BASE database (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) according to their homology to the rat sequences in an analogous approach.

For the rat variable domains of the 11B7 and 11D5 antibodies the following bestfitting human germline sequences (V, D and J segments) were found and defined as human framework:

VL11B7hum: Vκ1-O12 + Jk1
VH11B7hum: VH4-59 + D4-4 (reading frame 3) + JH4

VL11D5hum: Vκ1-L1 + Jκ4
VH11D5hum: VH4-59 + D4-4 (reading frame 3) + JH4

Leader sequences for humanized variable domains were adopted from the associated germline V-gene sequences as selected. CDR residues of rat anti-AXL antibodies defined according to Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991) were grafted into human germline frameworks for anti-AXL specificity to obtain the final humanized version of anti-AXL antibodies hum11B7 and hum11D5.

The protein sequences of the humanized anti-AXL antibodies hum11B7 and hum11D5 are as follows:

Protein sequences were back translated into DNA sequences. DNA sequences were CODON optimized for recombinant expression in mammalian cells using the Kazusa-Codon-Usage Database. The resulting DNA sequences for the humanized anti-AXL antibodies are as follows:

The optimized DNA sequences encoding for the humanized anti-AXL antibodies were synthesized by a PCR-method based on overlapping oligonucleotides.

VL-genes were cloned into pCEP4 vector utilizing the plasmid of the chimeric antibody construct pCEP4_ch11B7k1. Cloning sites are NheI (5´) and BsiWI (3´) which were already included in the synthesized genes of the humanized antibodies. VH genes were cloned into the corresponding chimeric heavy chain vector pCEP-PU_ch11B7g1 utilizing KpnI (5´) and BlpI (3´) as restriction sites. DNA optimization, gene synthesis, cloning and sequence verification was conducted at Eurofins Medigenomix GmbH, Martinsried, Germany.

Example 20. Rat and chimeric anti-Axl antibodies of the invention inhibit ligand-induced Axl phosphorylation *in vitro* to similar extent

Chimeric derivatives of the rat anti-Axl antibodies 11B7 and 11D5 were generated as part of this invention (see below). In order to investigate whether the rat anti-Axl antibodies of the invention and the corresponding chimeric anti-Axl antibodies of the invention were able to inhibit ligand Gas6-mediated Axl activation *in vitro* to similar extent, ELISA experiments on CaSki cervical cancer cells were performed. Gas6-mediated Axl activation was thereby detected by increased receptor tyrosine phosphorylation. In brief, on day 1, $3x10^4$ cells per well were seeded in normal growth medium in flat-bottom 96 well plates. The next day, growth medium was replaced by serum-free medium to starve cells over night for 24 h. Also over night, black Maxi-Sorp 96 well plates (Nunc) were coated with mouse anti-phospho-tyrosine antibody 4G10 at 2 µg/ml PBS and 4°C. On day 3, the 4G10 antibody solution was removed and Maxi-Sorp wells were blocked with PBS, 0.5% BSA for at lest 4 h at room temperature. In parallel, cells were pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-Axl antibody 11B7 or chimeric anti-Axl antibody ch11B7 for 1 h at 37°C and subsequently treated with or without 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C. Medium was then flicked out and cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerine, and 1% Triton X-100) supplemented with phosphatase and protease inhibitors (10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1

mM orthovanadate, 1 mM NaF, and 0,5% aprotinin) for 30 min on ice. Meanwhile, blocking buffer was removed and Maxi-Sorp plates were washed 6x with wash buffer (PBS, 0.05% Tween 20), before lysates were transferred and incubated over night at 4°C. After plates were washed 6x with wash buffer on day 4, wells were incubated with biotinylated rat anti-Axl antibody 12B7 at 0.5 µg/ml PBS for 2 h at room temperature. Plates were washed 6x with wash buffer and AP-conjugated streptavidin (Chemicon #SA110) diluted 1:4,000 in PBS was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, wells were washed 6x with wash buffer and AttoPhos substrate solution (Roche #11681982) was added. Using a Victor plate reader (Perkin Elmer), the fluorescence of each well was collected at an excitation wavelength of 430 nm and an emission wavelength of 580nm.

Figure 17 shows representative results of this experiment for the cervical cancer cell line CaSki. As demonstrated by concentration-dependent decrease of the relative Axl phosphorylation, the rat anti-Axl antibody 11B7 (A) and the chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B) of the invention were able to block ligand-induced activation of the receptor tyrosine kinase Axl to similar extent. Comparable effects applying the same experimental settings were observed with the melanoma cell line C-8161.

Example 21. Rat and chimeric anti-Axl antibodies of the invention inhibit ligand-induced p42/p44 MAP-Kinase phosphorylation *in vitro* to similar extent

To additionally verify whether the rat anti-Axl antibodies of the invention and the corresponding chimeric anti-Axl antibodies of the invention were also able to inhibit Gas6-induced activation of p42/p44 MAP-Kinase in CaSki cervical cancer cells to similar extent, ELISA experiments were performed. Here, Gas6-induced p42/p44 MAP-Kinase activation was detected by increased protein (Thr202/Tyr204) phosphorylation. In brief, on the first day, $2x10^4$ cells per well were seeded in flat-bottom 96 well plates. The next day, normal growth medium was replaced by serum-free medium to starve cells

for 24 h. Thereafter, cells were pre-incubated with 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml, and 10 µg/ml of rat anti-Axl antibody 11B7 or chimeric anti-Axl antibody ch11B7 for 1 h at 37°C and then treated with or without 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems) for 10 min at 37°C. Medium was flicked out and cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.5) for 30 min at room temperature. Formaldehyde solution was removed and cells were washed twice with wash buffer (PBS, 0.1% Tween 20). Cells were quenched with 1% H_2O_2, 0.1% NaN_3 in wash buffer and incubated for 20 min at room temperature. Afterwards, the quenching solution was removed, and cells were washed twice with wash buffer and blocked with PBS, 0.5% BSA for 4 h at room temperature. Anti-phospho-p42/p44 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) primary antibody (polyclonal rabbit; Cell Signaling #9101) diluted 1:1,000 in PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5 mM EDTA was added over night at 4°C. On day 4, the antibody solution was removed and the plate was washed 3x with wash buffer. HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Dianova #111-036-045) diluted 1:2,500 in PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5 mM EDTA was then added to each well and incubated for 1.5 h at room temperature. The plate was washed 3x with wash buffer for 5 min each. Tetramethylbenzidine (TMB, Calbiochem) was added and monitored at 620 nm. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 250 nM HCl and the absorbance was read at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm using a Vmax plate reader (Thermo Lab Systems).

Figure 18 shows representative results of this experiment. The rat anti-Axl antibody 11B7 (A) and the chimeric anti-Axl antibody ch11B7 (B) of the invention were able to block Gas6-induced activation of p42/p44 MAP-Kinase in CaSki cervical cancer cells to similar extent as indicated by concentration-dependent decrease of the relative p42/p44 MAP-Kinase phosphorylation.

Example 22. Rat anti-Axl antibodies of the invention synergize with chemotherapeutic agents to overcome drug resistance *in vitro*

As rat anti-Axl antibodies of the invention turned out to interfere with Gas6-mediated anti-apoptosis of serum-starved NIH3T3-Axl cl.7 fibroblasts, the question arose, whether antagonistic anti-Axl antibodies would synergize with chemotherapeutic agents in inducing apoptosis, thereby contributing to overcome drug resistance. In this example, NCI/ADR-RES (originally named MCF-7/AdrR) cells - a ovarian cancer cell line (Liscovitch and Ravid, 2007, Cancer Letters, 245, 350-352) displaying a high level of resistance to several agents including doxorubicin (Fairchild et al., 1987, Cancer Research, 47, 5141-5148; Xu et al., 2002, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302, 963-971) – were incubated with the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 and/or doxorubicin, and apoptosis rates were determined by TUNEL staining. In brief, $3x10^4$ NCI/ADR-RES cells in normal growth medium were seeded per well of an 8-chamber culture slide (BD Falcon, cat# 354118) which were pre-incubated with the same medium for 1 h at 37°C. The next morning, normal growth medium was removed and cells were washed with and cultured in serum-reduced (0.5% FCS) medium. In the evening, isotypic control antibody 1D5 or the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 were added at final concentrations of 10 µg/ml each. In the morning of day 3, doxorubicin at final concentrations of 100 µM, 150 µM, or 200 µM was added, and cells were incubated at 37°C. After 24 h, cells were rinsed once with PBS, fixed with 4% formaldehyde in PBS (pH 7.5) for 20 min at room temperature, air-dried for 5 min, and stored at -20°C. Using the commercially available Fluorescein-FragEL™ kit (Oncogene, cat# QIA39, presently being distributed through Merck-Calbiochem), TUNEL staining was performed according to the supplier's manual instructions (chapter 'Fluorescein-FragEL™ of cell preparations fixed on slides', page 10). Applying fluorescence microscopy, cells were analyzed and photos were taken.

Figure 19 shows representative results of this experiment. No TUNEL staining, and hence no apoptosis, was observed with NCI/ADR-RES ovarian cancer cells that were treated with 100 µM of doxorubicin, regardless of

whether cells have been co-incubated with control antibody or the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 (top). However, at a concentration of 150 µM of doxorubicin, only very week apoptosis could be detected in cells co-treated with control antibody, whereas co-incubation with the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 resulted in a substantial induction of apoptosis (middle). Also in the presence of 200 µM of doxorubicin, co-incubation of cells with 11B7 significantly increased apoptosis rates as compared to cells being incubated with control IgG antibody (bottom), indicating that co-treatment of even multi drug-resistant cells with both chemotherapeutic agents and antagonistic anti-Axl antibodies of the invention may be suitable to overcome drug resistance.

Example 23. Rat anti-Axl antibodies of the invention synergize with chemotherapeutic agents in reducing anchorage-independent colony growth *in vitro*

Soft agar assays were conducted in order to investigate the ability of anti-Axl antibodies of the invention to inhibit anchorage-independent cell growth either alone or in combination with chemotherapeutic agents. The soft agar colony formation assay is a standard *in vitro* assay to test for transformed cells, as only transformed cells are able to grow in soft agar.

In brief, 750 C-8161 melanoma cells either remained untreated or were pre-incubated with the antagonistic rat anti-Axl antibody 11B7 at 15 µg/ml in IMDM medium (Gibco) for 30 min at 37°C. Subsequently, cells were combined with Difco noble agar solution resulting in 50 µl of top agar cell suspension at concentrations of Agar, FCS, and 11B7 of 0.35%, 0.2%, and 7.5 µg/ml, respectively. This cell suspension was plated on top of 50 µl of a 0.7% agarose bottom layer containing 20% FCS, and was finally covered with another 50 µl of a feeding layer solution that contains 0.2% FCS as well as cisplatin in according concentrations. In the whole of 150 µl per sample, the final concentrations of 11B7 and cisplatin were 2.5 µg/ml and 1.5 µM, 1.0 µM, 0.75 µM, 0.5 µM, or 0.25 µM, respectively. Colonies were allowed to form for 5 days and were then stained with 50 µl MTT (Sigma, 1 mg/ml in

PBS) for 3 hours at 37°C. Using a Scanalyzer HTS camera system in conjunction with the HTS Bonit coloniy formation software (Lemnatec, Wuerselen), the effect of the antagonistic rat anti-Axl antibody 11B7 in the absence or presence of cisplatin were analyzed in triplicates.

Figure 20 shows representative results of this experiment. The presented data refer to the overall area of colonies and reflect both the absolute numbers being measured (A) and the relative growth inhibition (B) exerted by cisplatin and/or the antagonistic rat anti-Axl antibodies 11B7. As compared to untreated control cells, incubation with cisplatin led to colony growth retardation in a dose-dependent manner. In line with the inhibitory effect of 11B7 alone in the range of 30%, combination with the antagonistic anti-Axl antibody 11B7 resulted in a significantly potentiated inhibitory effect of cisplatin on soft agar growth of C-8161 melanoma cells, particularly at lower concentrations of cisplatin.

Example 24. Rat anti-Axl antibodies of the invention synergize with anti-neoplastic agents in reducing tumor-related phenomena

In the previous examples, synergistic effects of antagonistic anti-Axl antibodies of the invention co-administered with doxorubicin have been observed with regard to inducing apoptosis and overcoming drug resistance in multi drug-resistant cancer cells such as the ovarian cancer cell line NCI/ADR-RES. Moreover, combination effects of antagonistic anti-Axl antibodies of the invention and cisplatin in reducing anchorage-independent colony growth were detected with the melanoma cell line C-8161. Therefore, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when cancer cells or patients suffering from cancer diseases are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or one or more further anti-neoplastic agent. In particular, synergistic effects in

inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when melanoma cells or patients suffering from melanoma are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to cisplatin, dacarbazine, temozolomide/temodal, muphoran/fotemustine, paclitaxel, or docetaxel. Furthermore, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when ovarian cancer cells or patients suffering from ovarian cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to doxorubicin, cisplatin, carboplatin, paclitaxel, docetaxel, melphalan, altretamine, topotecan, ifosfamide, etoposide, or 5-fluorouracil. Additionally, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when prostate cancer cells or patients suffering from prostate cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to mitozantrone, doxorubicin, paclitaxel, docetaxel, or vinblastine. Moreover, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when gastric/stomach cancer cells or patients suffering from gastric/stomach cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to 5-fluorouracil, mitomycin C, cisplatin, doxorubicin, methotrexate,

etoposide, leucovorin, epirubicin, paclitaxel, docetaxel, or irinotecan. Also, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when breast cancer cells or patients suffering from breast cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to doxorubicin, epirubicin, paclitaxel, docetaxel, cyclophosphamide, 5-fluorouracil, gemcitabine, capecitabine, vinorelbine, or trastuzumab. Furthermore, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when cervical cancer cells or patients suffering from cervical cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to cisplatin, ifosfamide, irinotecan, 5-fluorouracil, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, or topotecan. Moreover, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when pancreatic cancer cells or patients suffering from pancreatic cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic agent which is preferably but not limited to gemcitabine, capecitabine, or 5-fluorouracil. Finally, but not excluding other cancer types, synergistic effects in inducing apoptosis in and/or overcoming drug resistance of tumor cells, suppressing tumor cell survival, inhibiting tumor cell growth and/or proliferation, reducing tumor cell migration, spreading and metastasis, or impairing tumor angiogenesis are to be expected when lung cancer cells or patients suffering from lung cancer are treated with antagonistic anti-Axl antibodies in combination with irradiation and/or any further anti-neoplastic

agent which is preferably but not limited to cisplatin, carboplatin, doxorubicin, paclitaxel, docetaxel, etoposide, vinorelbine, vincristine, ifosfamide, gemcitabine, methotrexate, cyclophosphamide, lomustine, or topotecan.

Claims

1. A monoclonal antibody that binds to the extracellular domain of AXL and at least partially inhibits AXL activity.

2. The monoclonal antibody of claim 1, which reduces and/or blocks AXL-mediated signal transduction.

3. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-2, which reduces and/or blocks AXL phosphorylation.

4. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-3, which reduces and/or blocks cell proliferation.

5. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-4, which reduces and/or blocks angiogenesis.

6. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-5, which reduces and/or blocks cell migration.

7. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-6, which reduces and/or blocks tumor metastasis.

8. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-7, which reduces and/or blocks the AXL mediated anti-apoptosis.

9. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-8 , which reduces and/or blocks AXL mediated PI3K signaling.

10. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-9, which is a recombinant antibody, a humanized antibody, a chimeric antibody, a

multispecific antibody, or a fragment thereof.

11. The monoclonal antibody of claim 10, which is a chimeric antibody and comprises a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 38, 39, 41, 42, or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 37, 40, or at least the variable domain thereof or an amino acid having a sequence identity of at least 90% thereto or an antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

12. The monoclonal antibody of claim 10, which is a humanized antibody and comprises a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 44, 46 or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 43, 45, or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto or an antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

13. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-12, which is a Fab fragment, a Fab' fragment, a F(ab'), fragment, a Fv fragment, a diabody, or a single chain antibody molecule.

14. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-13, which is of the IgG1-, IgG2-, IgG3-or IgG4-type.

15. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-14, which is coupled to a labelling group.

16. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-15, which is

coupled to an effector-group.

17. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-16, which is a scaffold protein.

18. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-17 which comprises at least:
one heavy chain amino acid sequence comprising at least one CDR selected from the group consisting of
(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NOs: 16, 22, 28, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NOs: 17, 23, 29 or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and
(c) a CDRH3 as shown in SEQ ID NOs: 18, 24, 30, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
and/or at least:
one light chain amino acid sequence comprising at least one CDR selected from the group consisting of
(d) a CDRL1 as shown in SEQ ID NOs: 13, 19, 25, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(e) a CDRL2 as shown in SEQ ID NOs: 14, 20, 26, or a CDRL2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and
(f) a CDRL3 as shown in SEQ ID NOs: 15, 21, 27, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
or a monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

19. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-17 which comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of
(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 16, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,
(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 17, or a CDRH2 sequence

differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and

(c) a CDRH3 as shown in SEQ ID NO: 18, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ ID NO: 13, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(e) a CDRL2 as shown in SEQ ID NO: 14, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and

(f) a CDRL3 as shown in SEQ ID NO: 15, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

20. The monoclonal antibody according to any one of claims 1-17 which comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 22, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 23, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and

(c) a CDRH3 as shown in SEQ ID NO: 24, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ ID NO: 19, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(e) a CDRL2 as shown in SEQ ID NO: 20, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and

(f) a CDRL3 as shown in SEQ ID NO: 21, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

21. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-17 which

comprises a heavy chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(a) a CDRH1 as shown in SEQ ID NO: 28, or a CDRH1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(b) a CDRH2 as shown in SEQ ID NO: 29, or a CDRH2 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, and

(c) a CDRH3 as shown in SEQ ID NO: 30, or a CDRH3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

and/or a light chain comprising at least one CDR selected from the group consisting of

(d) a CDRL1 as shown in SEQ ID NO: 25, or a CDRL1 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom,

(e) a CDRL2 as shown in SEQ ID NO: 26, or a CDRL2 sequence differing in one or two amino acids therefrom, and

(f) a CDRL3 as shown in SEQ ID NO: 27, or a CDRL3 sequence differing in 1 or 2 amino acids therefrom, or an monoclonal antibody recognizing the same epitope on the extracellular domain of AXL.

22. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-17, which comprises a heavy chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 10, 12, or at least the variable domain thereof or an amino acid having a sequence identity of at least 90% thereto and/or a light chain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 7, 9, 11, or at least the variable domain thereof or an amino acid sequence having a sequence identity of at least 90% thereto or an antibody recognizing the same epitope on the extracellular dornain of AXL.

23. An isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:

(a) a nucleic acid sequence encoding an monoclonal antibody, antibody fragment or a derivative thereof of any of claims 1-22,

(b) a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID NOs: : 1-6, 31-36,

(c) a nucleic acid complementary to any of the sequences in (a) or (b); and

(d) a nucleic acid sequence capable of hybridizing to (a), (b) or (c) under stringent conditions.

24. A vector comprising a nucleic acid sequence of claim 23.

25. The vector according to claim 24, which is an expression vector and the nucleic acid sequence is operably linked to a control sequence.

26. A host comprising the vector of claim 24 or 25.

27. The host of claim 26 which is a human, bacteria, animal, fungal, amphibian or plant cell.

28. The host of claim 26 which is a non-human transgenic animal.

29. A process of manufacturing a monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22 comprising the step of obtaining said polypeptide from the host of claim 26, 27 or 28.

30. A pharmaceutical composition comprising an anti-AXL-antibody, preferably the monoclonal antibody of anyone of claims 1-22, the nucleic acid molecule of claim 23 the vector of claim 24 or 25, the host of claim 26, 27 or 28, or a polypeptide generated by the process of claim 29.

31. The pharmaceutical composition of claim 30 comprising pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

32. The pharmaceutical composition according to claim 30 or 31, comprising a further active agent.

33. The pharmaceutical composition according to anyone of claims 30-32,

for the diagnosis, prevention or treatment of a hyperproliferative disease.

34. The pharmaceutical composition according to anyone of claims 30-33, wherein said hyperproliferative disease is associated with AXL expression, overexpression and/or hyperactivity.

35. The pharmaceutical composition of claim 33, wherein said hyperproliferative disease is selected from the group consisting of breast cancer, lung cancer and other AXL expressing or overexpressing cancers, and formation of tumor metastases.

36. The monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22, for the diagnosis, prevention or treatment of a hyperproliferative disease.

37. Use of the monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22 for the manufacture of a pharmaceutical composition for the diagnosis, prevention or treatment of a hyperproliferative disease.

38. The use according to claim 36 or 37, wherein said hyperproliferative disease is a hyperproliferative disease as defined in anyone of claims 34 or 35.

39. A method for diagnosing a condition associated with the expression of AXL, comprising contacting a sample with an monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22, and detecting the presence of AXL.

40. The method according to claim 39, wherein the condition is a hyperproliferative disease as defined in anyone of claims 34 or 35.

41. A method for preventing or treating a condition associated with the expression of AXL in a patient, comprising administering to a patient in need thereof an effective amount of at least the monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22.

42. The method according to claim 41, wherein the condition is a hyperproliferative disease as defined in anyone of claims 34 or 35.

43. The method according to claim 41 or 42, wherein the patient is a mammalian patient, particularly a human patient.

44. A kit comprising an anti-AXL-antibody, preferably a monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22, a nucleic acid sequence according to claim 23 or a vector according to claim 24 or 25.

45. The kit according to claim 44, further comprising a further antineoplastic agent.

46. Use of an anti-AXL antibody for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of drug resistant cancer.

47. Use according to claim 46, wherein the anti-AXL antibody is a monoclonal antibody according to anyone of claims 1-22.

48. Use of an anti-AXL antibody for the manufacture of a medicament for the co-administration with an antineoplastic agent for the treatment of a hyperproliferative disease.

49. Use according to claim 48, wherein the anti-AXL antibody is a monoclonal antibody according to any one of claims 1-22.

Figure 1

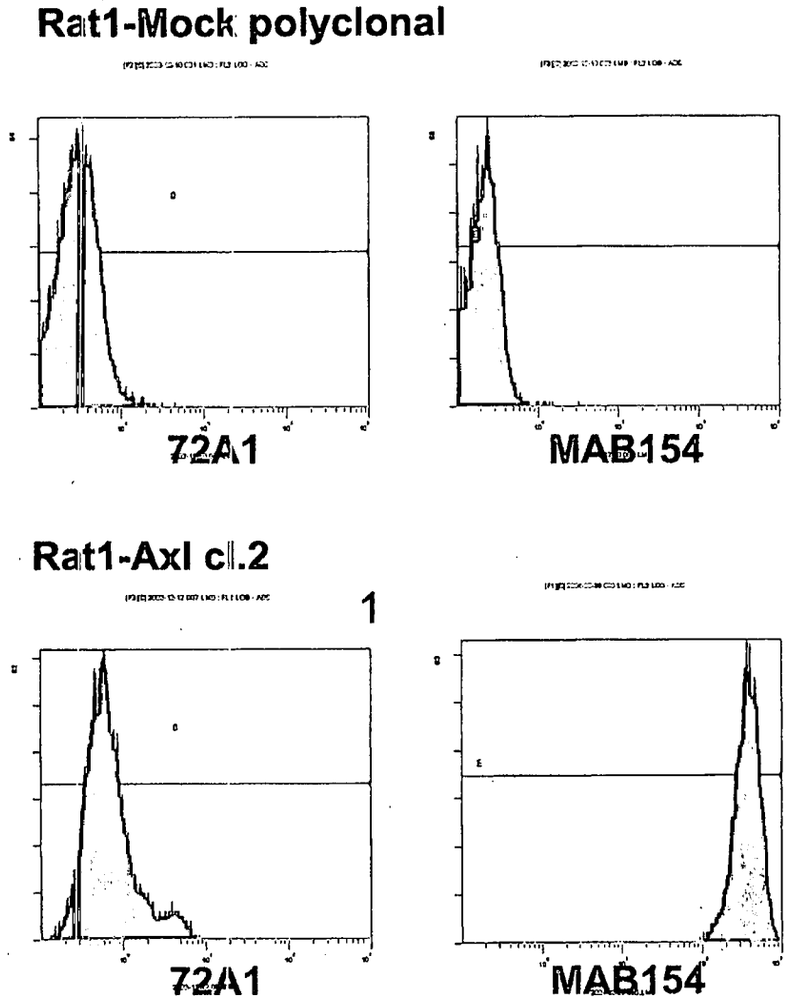


Figure 2

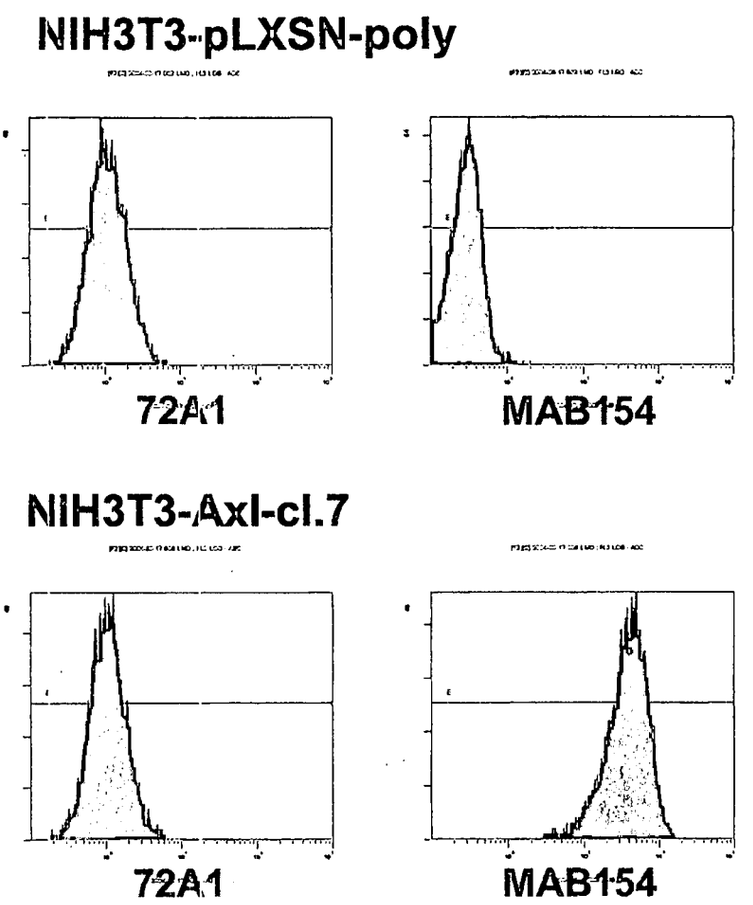


Figure 3

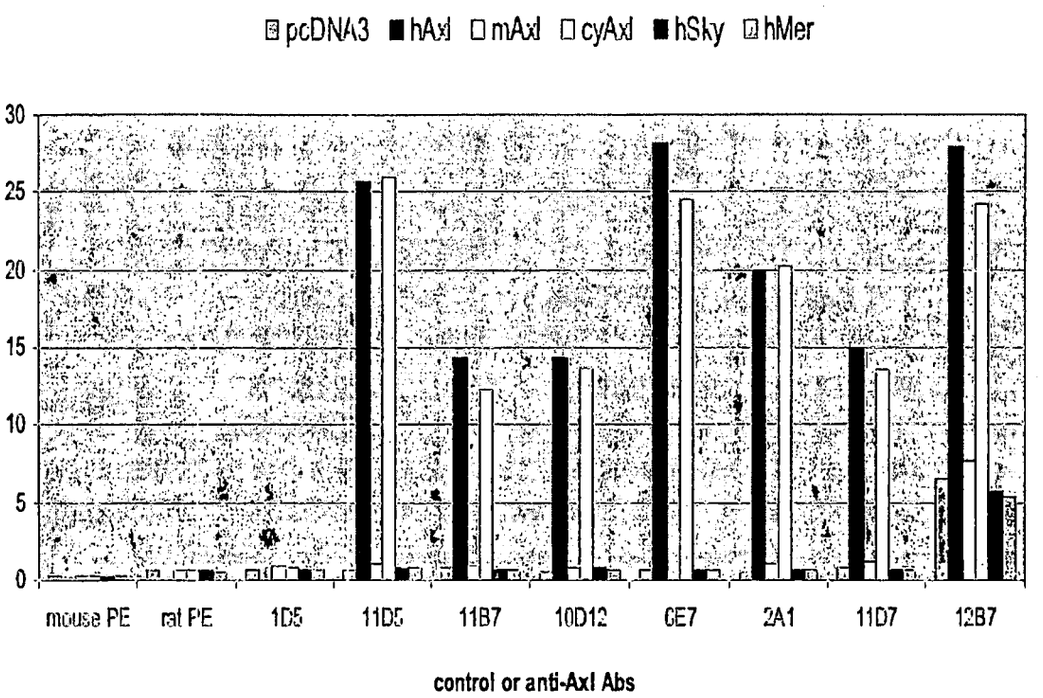
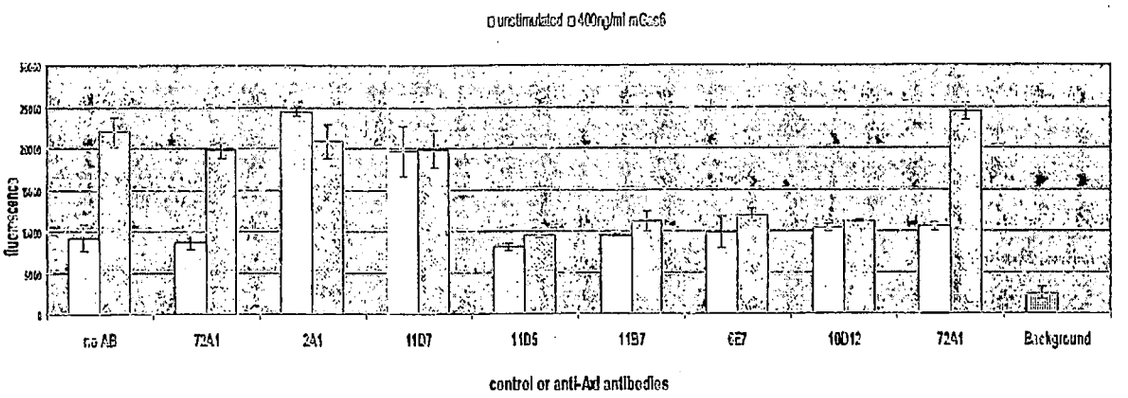

pcDNA3
hAxl
mAxl
cyAxl
hSky
hMer
30
25
20
15
10
5
0
mouse PE
rat PE
1D5
11D5
11B7
10D12
6E7
2A1
11D7
12B7
control or anti-Axl Abs

Figure 4

A NIH3T3-Axl cl.7



B NCI-H292

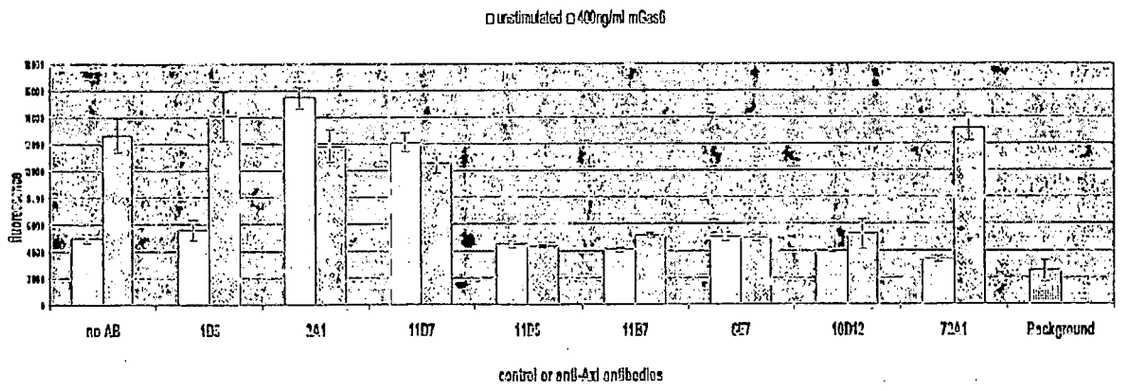


Figure 5

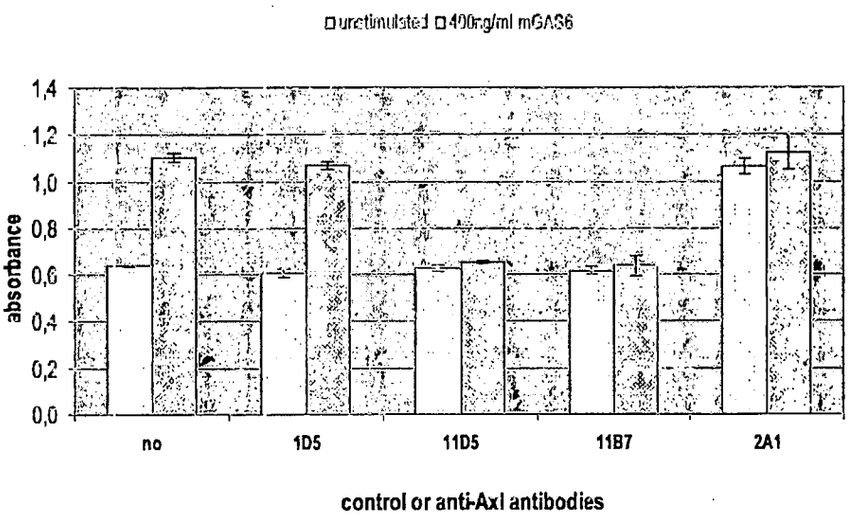
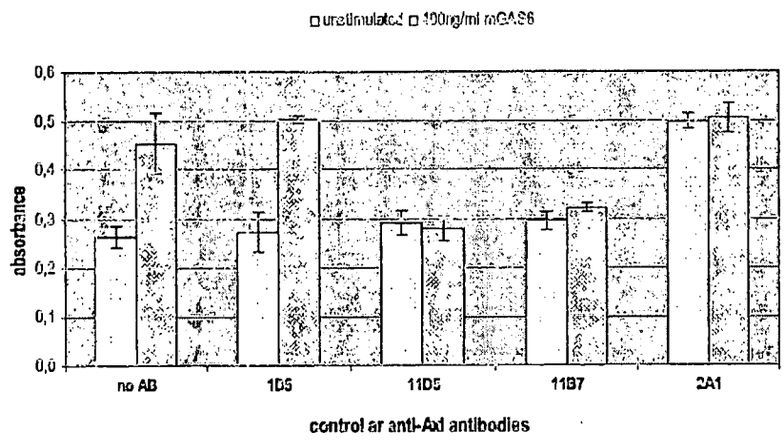

unstimulated 400ng/ml mGAS6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
absorbance
no
1D5
11D5
11B7
2A1
control or anti-Axl antibodies

Figure 6

A NIH3T3-Axl cl.7



B CaLu-1

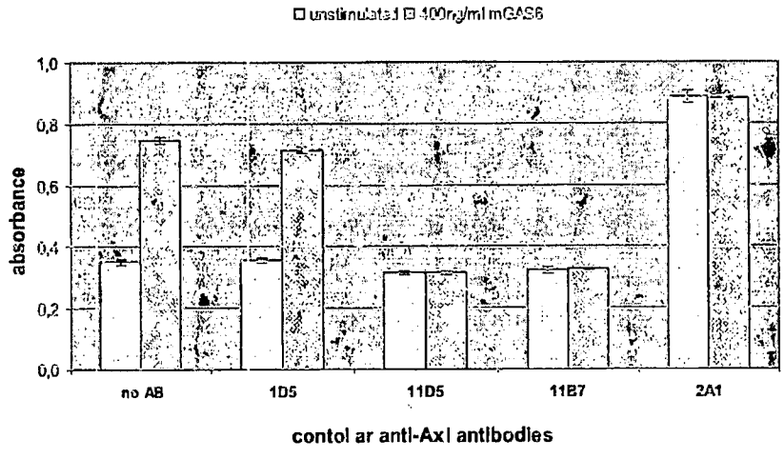
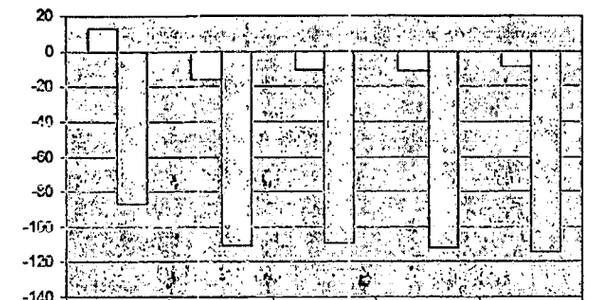


Figure 7

11B7 (rIgG2a)



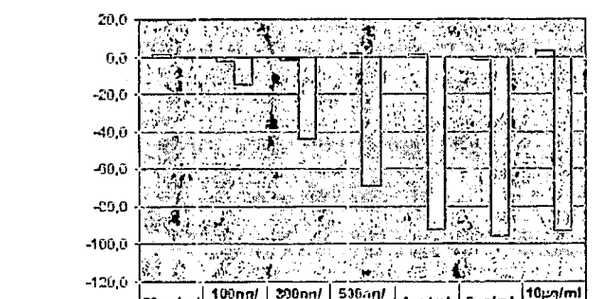
	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml
unst.	13	-16	-11	-11	-9
GAS6	-97	-110	-109	-112	-111

ch11B7 (hIgG2)



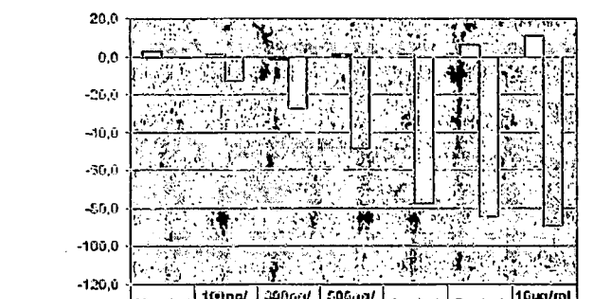
	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml
unst.	-3	-25	-8	-14	-7
GAS6	-54	-103	-102	-109	-104

11D5 (rIgG2a)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml AB
unstim.	2	-2	-1	2	1	-1	3
300ng/ml GAS6	0	-15	-44	-83	-92	-96	-93

ch11D5 (hIgG2)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml AB
unstim.	3	1	-2	2	2	0	11
300ng/ml GAS6	0	-12	-27	-49	-77	-84	-89

Figure 8

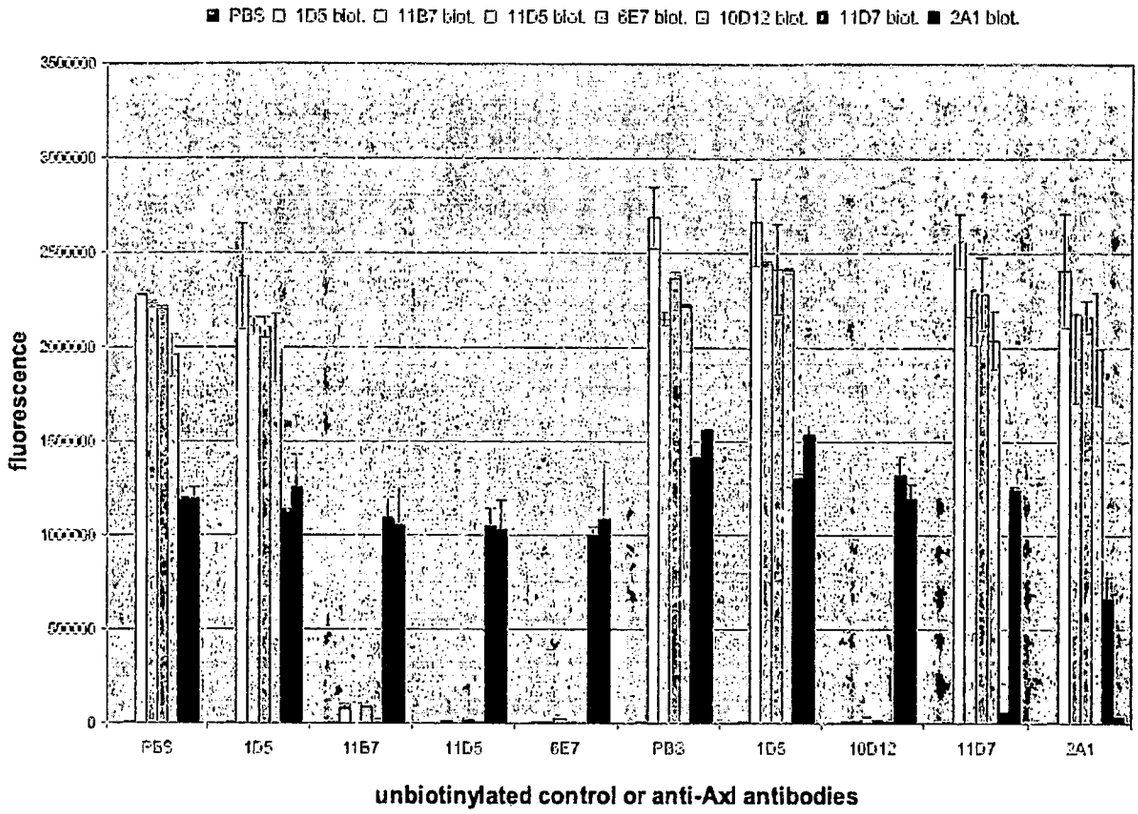

PBS 1D5 biot. 11B7 biot. 11D5 biot. 6E7 biot. 10D12 biot. 11D7 biot. 2A1 biot.
fluorescence
0
500000
1000000
1500000
2000000
2500000
3000000
3500000
PBS
1D5
11B7
11D5
6E7
PBS
1D5
10D12
11D7
2A1
unbiotinylated control or anti-Axl antibodies

Figure 9

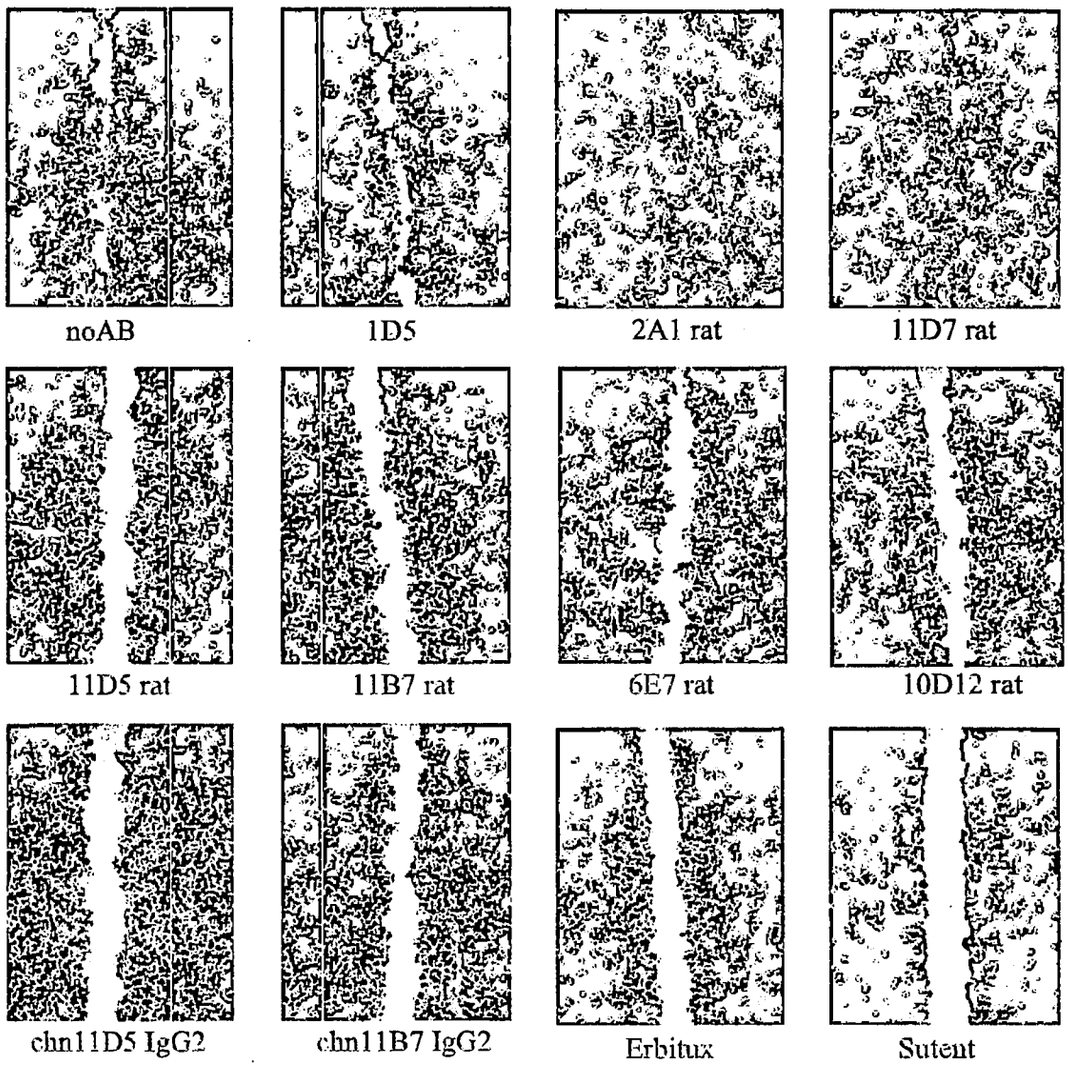

noAB
1D5
2A1 rat
11D7 rat
11D5 rat
11B7 rat
6E7 rat
10D12 rat
chn11D5 IgG2
chn11B7 IgG2
Erbitux
Sutent

Figure 10

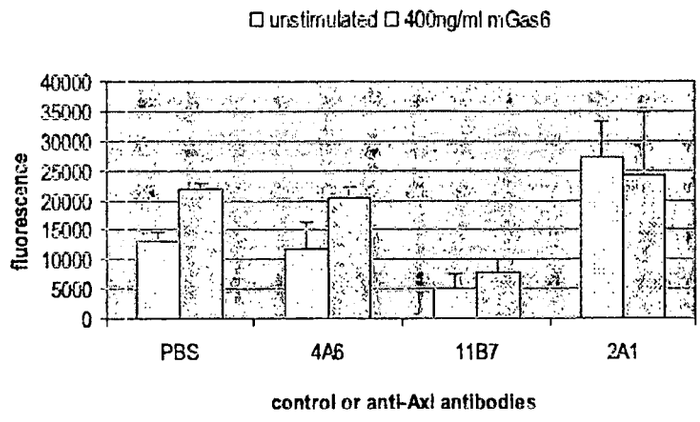

unstimulated
400ng/ml mGas6
fluorescence
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
4A6
11B7
2A1
control or anti-Axl antibodies

Figure 11

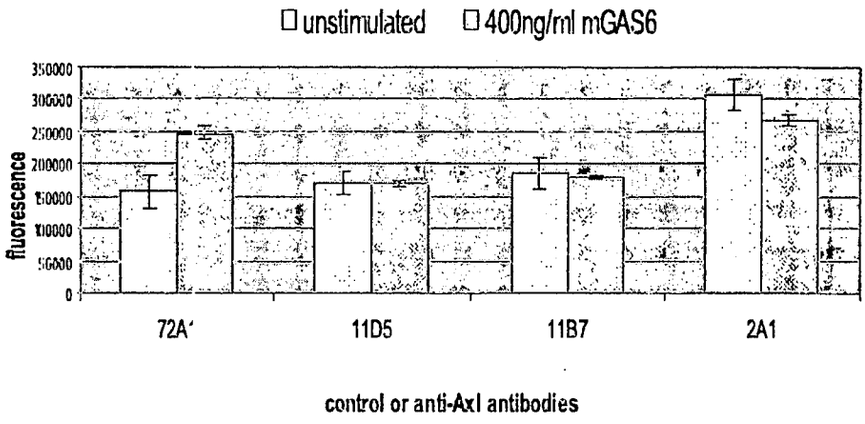

unstimulated
400ng/ml mGAS6
fluorescence
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
72A'
11D5
11B7
2A1
control or anti-Axl antibodies

Figure 12

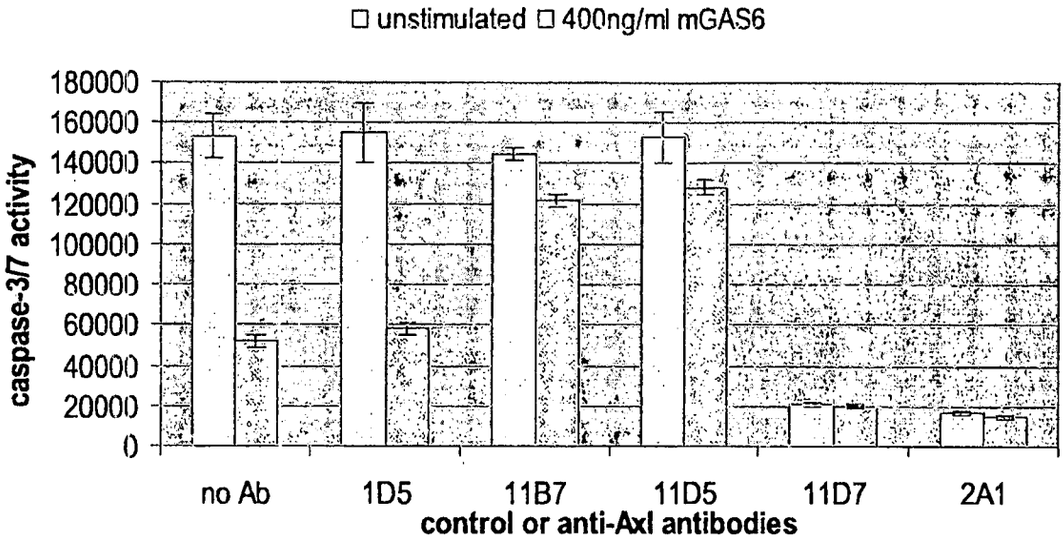
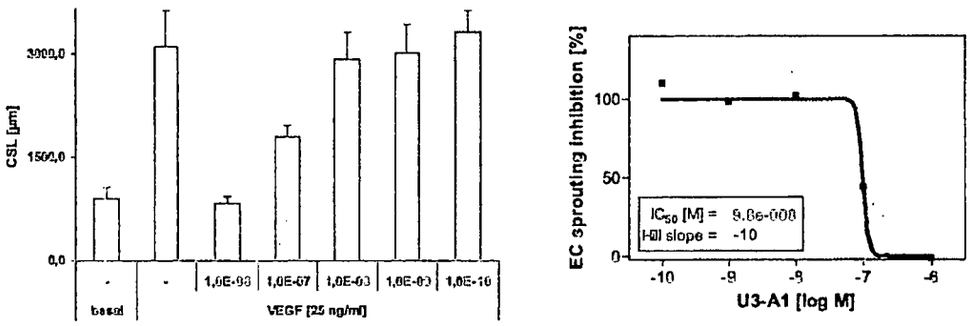

□ unstimulated □ 400ng/ml mGAS6
caspase-3/7 activity
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
no Ab
1D5
11B7
11D5
11D7
2A1
control or anti-Axl antibodies

Figure 13

A 11B7



B 11D5

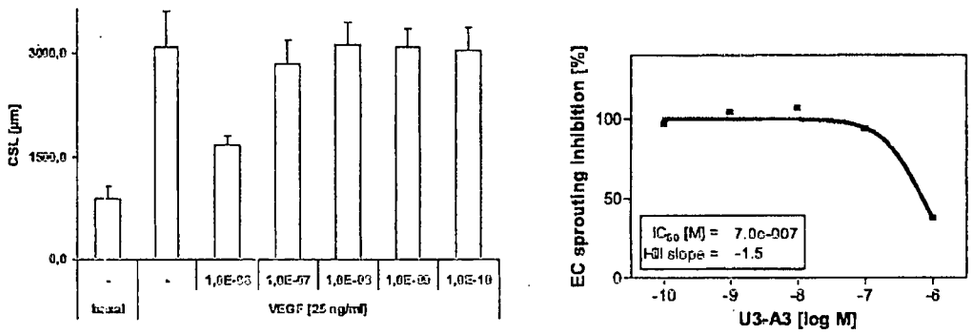


Figure 14

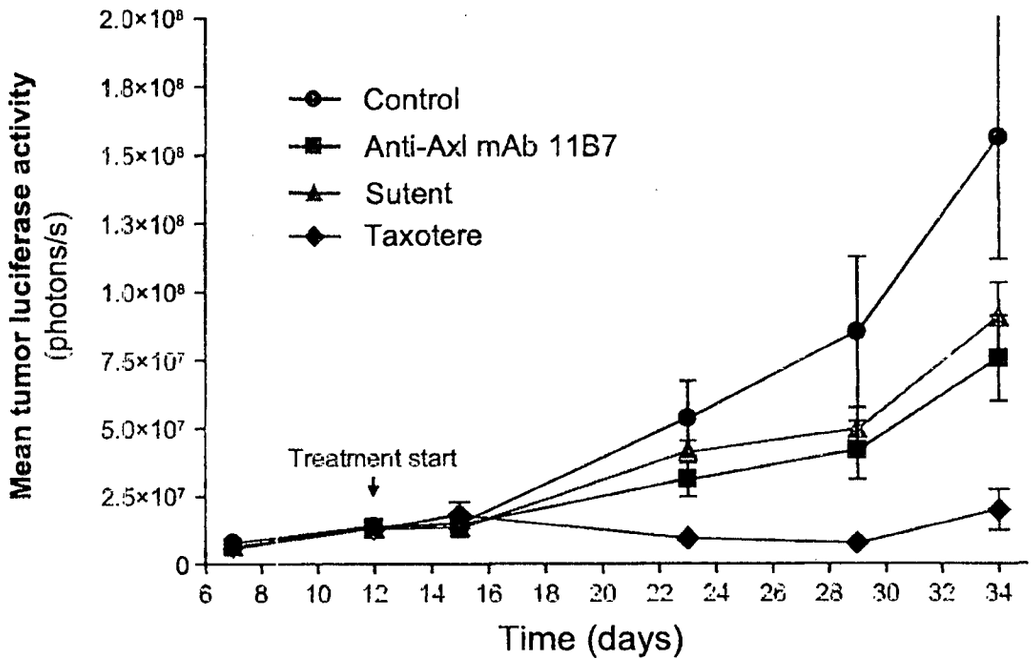

Mean tumor luciferase activity
(photons/s)
2.0×10⁸
1.8×10⁸
1.5×10⁸
1.3×10⁸
1.0×10⁸
7.5×10⁷
5.0×10⁷
2.5×10⁷
0
Control
Anti-Axl mAb 11B7
Sutent
Taxotere
Treatment start
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
Time (days)

Figure 15

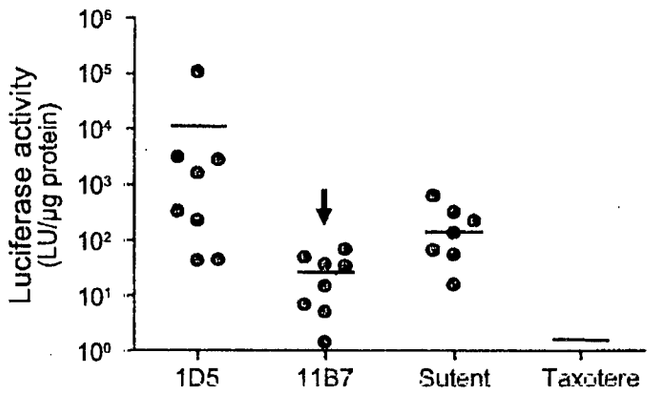
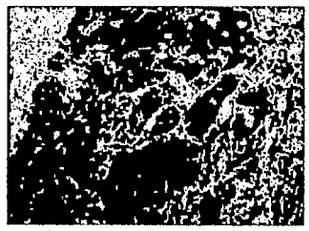

Luciferase activity
(LU/µg protein)
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
1D5
11B7
Sutent
Taxotere

Figure 16

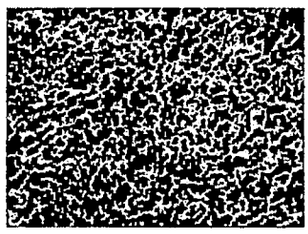
A

	Intensity ≥ 1	
	Tumor	Adjacent
Breast	3/3	0/3
Colon	3/11	0/11
Lung	2/9	0/9
Kidney	0/10	0/10
Fol. Lymphoma	0/12	0/3
Skin/Melanoma	1/13	0/12
Ovary	4/11	0/9
Prostate	0/11	0/9
Pancreas	2/9	0/11
Esophagus	4/10	0/10
Barrett	4/11	0/9
Stomach	6/10	0/7
Bladder	8/10	0/10
Cervix	7/9	0/9
Liver	3/9	0/7
Thyroid	5/9	0/11
Head & Neck	8/20	0/17

B



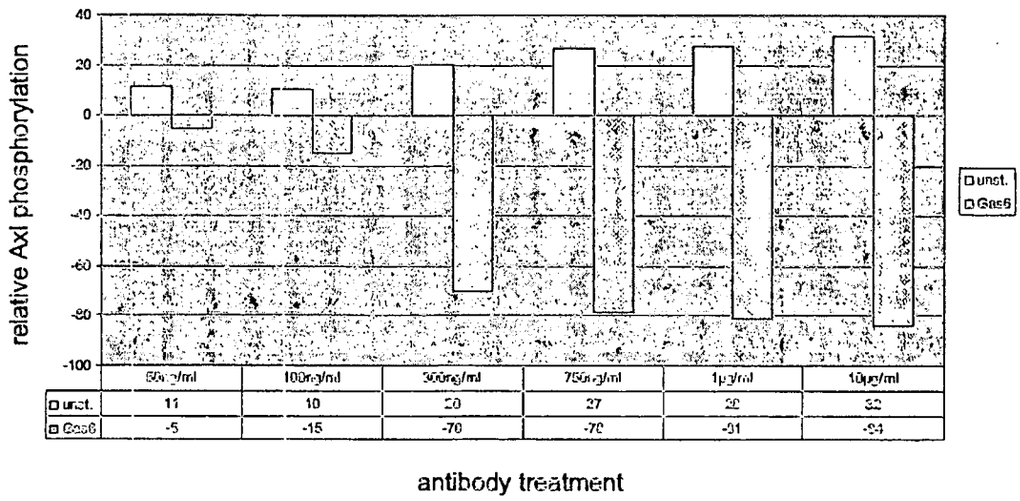
Breast cancer



Gastric signet ring cell carcinoma

Figure 17

A 11B7 (rIgG1)



B ch11B7 (hIgG1)

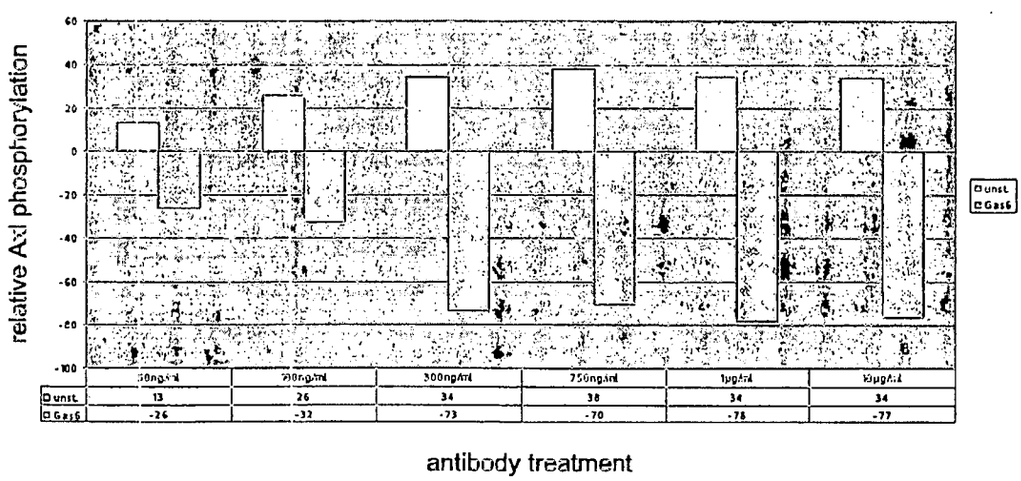
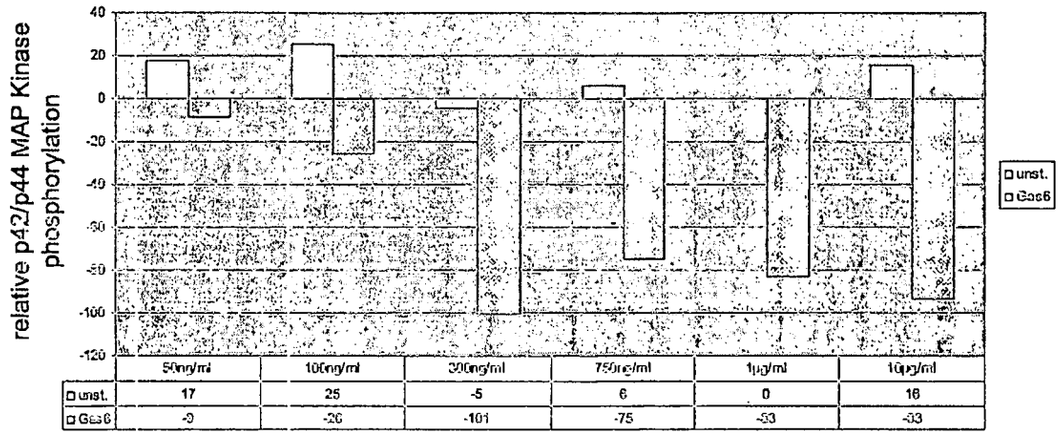


Figure 18

A 11B7 (rIgG1)



B ch11B7 (hIgG1)

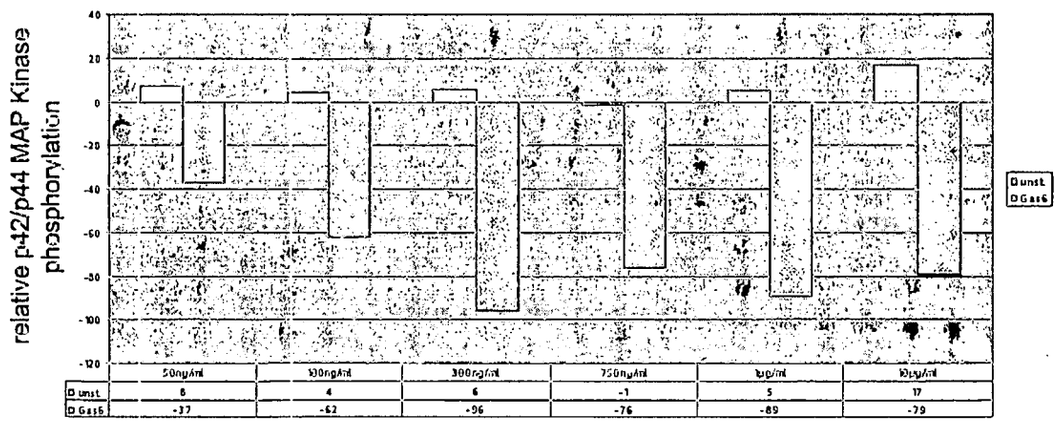


Figure 19

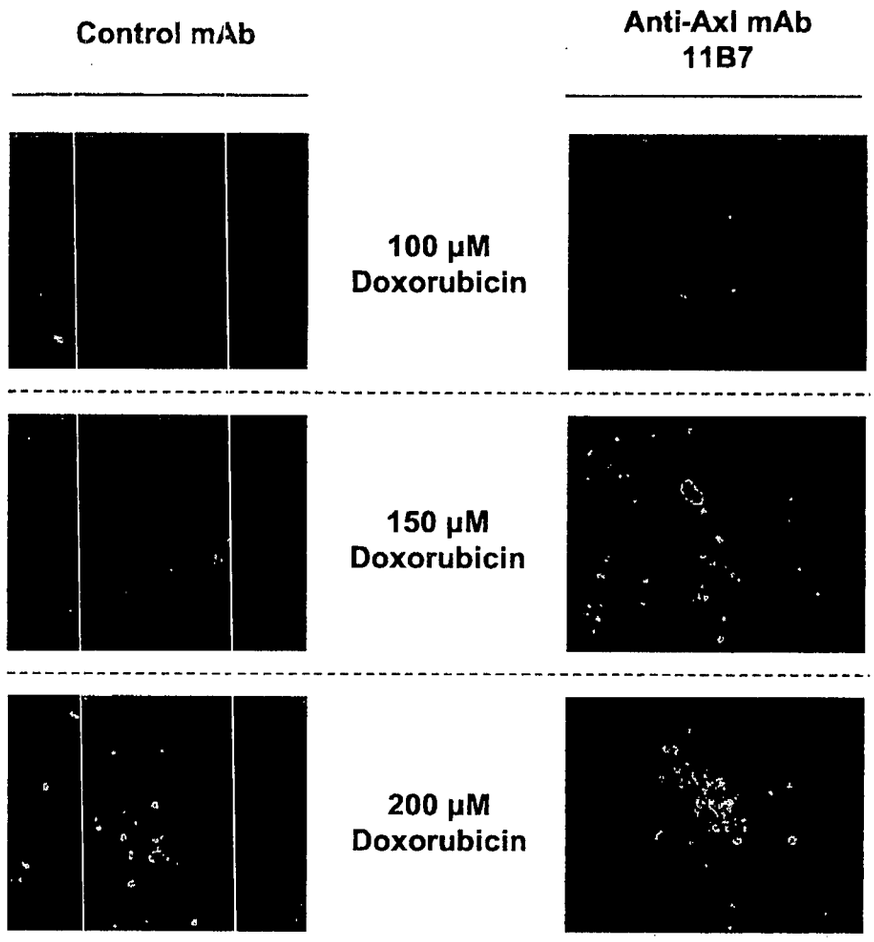
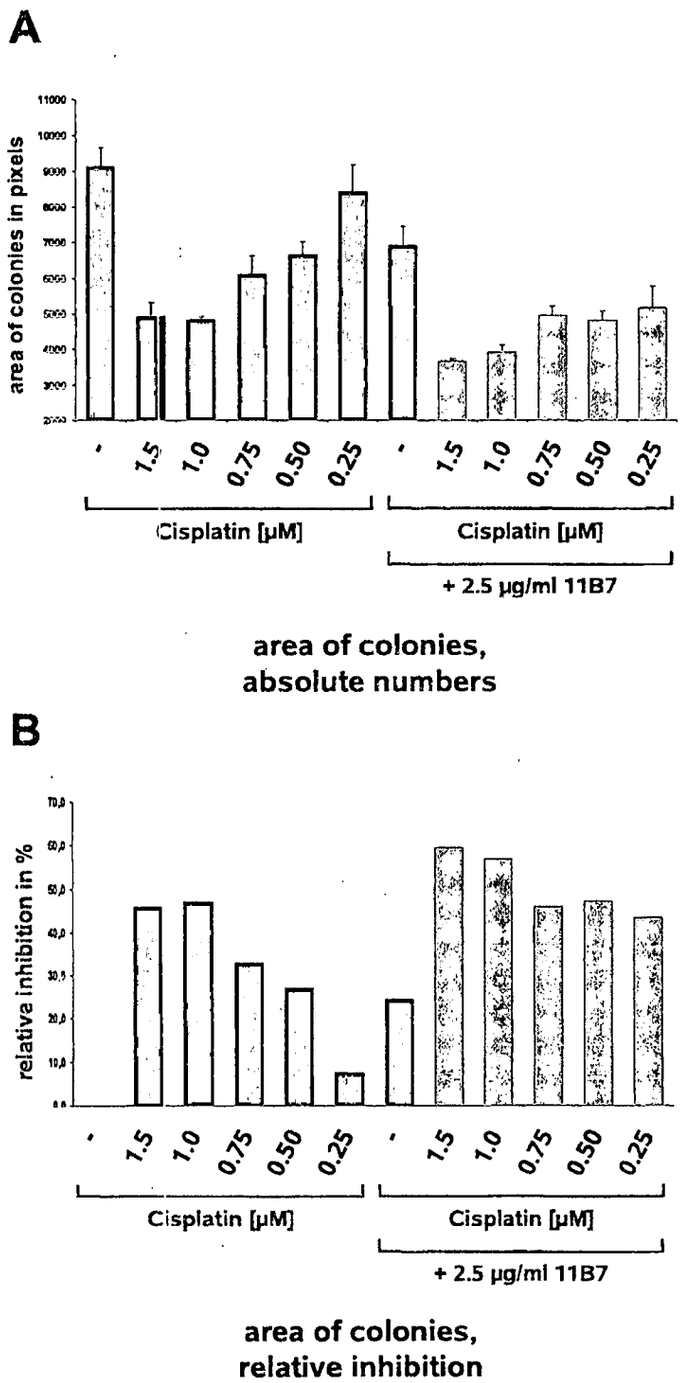

Control mAb
Anti-Axl mAb 11B7
100 µM Doxorubicin
150 µM Doxorubicin
200 µM Doxorubicin

Figure 20


A
area of colonies in pixels
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
-
1.5
1.0
0.75
0.50
0.25
Cisplatin [µM]
Cisplatin [µM]
+ 2.5 µg/ml 11B7
area of colonies,
absolute numbers
B
relative inhibition in %
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
Cisplatin [µM]
Cisplatin [µM]
+ 2.5 µg/ml 11B7
area of colonies,
relative inhibition

AXL Antibody Nucleotide sequence:

Seq. #1: Rat-11B7-VLkappa-clone 33:

```
1     GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG   50
51    ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT  100
101   AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT  150
151   GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTA  200
201   GGTCTGGGTCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA  250
251   TATGGCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTC  300
301   GGTGGA GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG                    350
```

Seq. #2. Rat-11B7-VH-clone 20:

```
1     GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT   50
51    CACTCTCCCTCACTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTAC  100
101   TGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGAT  150
151   ACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTCG  200
201   AATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTTG  250
251   AACTCTGTAACTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACAA  300
301   CCTTTT ATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCTCCTCA      350
```

Seq. #3: Rat-11D5-VLkappa-clone 10:

```
1     GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG   50
51    ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT  100
101   AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT  150
151   GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTA  200
201   GGTCTGGATCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA  250
251   TATGGCGATCTATTACTGTCTACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTC  300
301   GGTTCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG                    350
```

Seq. #4: Rat-11D5-VH-clone 66:

```
1     GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT   50
51    CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA  100
101   CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA  150
151   CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC  200
201   GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT  250
251   GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA  300
301   GCGTTT GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCGTCA     350
```

Seq. #5: Rat-10D12-VLkappa-clone 8:

```
1     GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG    50
51    ACAGAGTCACTATTGCTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT   100
101   AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT   150
151   GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTA   200
201   GGTCTGGGTCAGATTATTCTCGGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA   250
251   TATGGCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTC   300
301   GGTGGA GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGG                     350
```

Seq. #6: Rat-10D12-VH-clone 5:

```
1     GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAGCCCTCACAGT    50
51    CACTCTCCCTCACCTGCTCTGTCACCGGTTACTCCATCACTAGTAATTA   100
101   CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGA   150
151   TACATAACCAACAGTGGTGGCACTGCCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC   200
201   GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAATT   250
251   GAACTCTGTAATTCCTGAGGACTCAGCCACATACTTCTGTTCAAGAACC   300
301   CCCTGG GACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA 336     350
```

AXL Antibody Amino acid sequence:

11B7:

Seq. #7: Rat-11B7-VLkappa-clone 33:

```
1     DIQMTQAPSSLPASLGDRVTITCRASQDIGNYLRWFQQKPGKSPRLMIS   50
51    GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMADYYCLQSKESPWTF  100
101   GGGTKLELKR                                         150
```

Seq. #8: Rat-11B7-VH-clone 20:

```
1     EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGDKMEWMG   50
51    YITYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCAIT  100
101   TFYYWGQGVMVTVSS                                    150
```

11D5:

Seq. #9: Rat-11D5-VLkappa-clone 10:

```
1     DIQMTQSPSSMSTSLGDRVTITCRASQDIGIYLSWFQQKVGKSPKPMIY   50
51    GAIKLAVGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDMAIYYCLQYIQFPLTF  100
101   GSGTKLELKR                                         150
```

Seq. #10: Rat-11D5-VH-clone 66:

```
1     EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWIG   50
51    HITNSGNTTYNPSLKSRISISRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAIG  100
101   AFDYWGQGVMVTVSS                                    150
```

10D12:

Seq. #11: Rat-10D12-VLkappa-clone 8:

```
1     DIQMTQAPSSLPASLGDRVTIACRASQDIGNYLRWFQQKPGKSPKLMIS   50
51    GATNLAAGVPSRFSGSRSGSDYSRTISSLESEDMADYYCLQSKESPWTF  100
101   GGGTKLELKR                                         150
```

Seq. #712: Rat-10D12-VH-clone 5:

```
1     EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSNYWGWIRKFPGNKMEWMG   50
51    YITNSGGTAYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDSATYFCSRT  100
101   PWDWGQGVMVTVSS                                      150
```

CDR Sequences

SeqID No:	Antibody	CDR	Sequence
#13	11B7 Light chain	1	RASQDIGNYLR
#14	11B7 Light chain	2	GATNLAA
#15	11B7 Light chain	3	LQSKESPWT
#16	11B7 Heavy Chain	1	SNYWG
#17	11B7 Heavy Chain	2	YITYSGSTSYNPSLKS
#18	11B7 Heavy Chain	3	----TTFYY
#19	11D5 Light Chain	1	RASQDIGNYLS
#20	11D5 Light Chain	2	GAIKLAV
#21	11D5 Light Chain	3	LQYIQFPLT
#22	11D5 Heavy Chain	1	SNYWG
#23	11D5 Heavy Chain	2	HITNEGNTTYNPSLKS
#24	11D5 Heavy Chain	3	----GAFDY
#25	10D12 Light Chain	1	RASQDIGNYLR
#26	10D12 Light Chain	2	GATNLAA
#27	10D12 Light Chain	3	LQSKESPWT
#28	10D12 Heavy Chain	1	SNYWG
#29	10D12 Heavy Chain	2	YITNSGGTAYNPSLKS
#30	10D12 Heavy Chain	3	----TPWD-

Chimerization nucleotide sequences

Seq. #31: ch11B7k

```
1     GACATCCAGATGACCCAGGCTCCATCTTCCCTGCCTGCATCTCTGGGAG    50
51    ACAGAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGCCAAGACATTGGAAATTATTT   100
101   AAGATGGTTCCAGCAGAAACCGGGGAAATCTCCTAGGCTTATGATTTCT   150
151   GGTGCAACCAACTTGGCAGCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTA   200
201   GGTCTGGGTCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA   250
251   TATG                                               300
301   GCAGACTATTACTGTCTACAGTCTAAAGAGTCCCCTTGGACGTTCGGTG   350
351   GAGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT   400
401   CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT   450
451   GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA   500
500   AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA   550
551   GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG   600
601   AGCAAA                                             650
      GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
      GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
```

Seq. #32: ch11B7g1

```
1       GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT    50
51      CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA   100
101     CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA   150
151     TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC   200
201     GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT   250
251     GAACTCTGTAACTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA   300
301     ACCTTT                                              350
351     TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA   400
401     AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG   450
451     GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG   500
500     GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT   550
551     TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT   600
601     GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG   650
651     AATCAC                                              700
701     AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG   750
751     ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG   800
800     ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC   850
851     TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG   900
901     ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA   950
951     TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG   1000
1001    GTCAGT                                              1050
1051    CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG   1100
1101    GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC   1150
1151    CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA   1200
1200    TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA   1250
1251    AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA   1300
1301    GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
        TCCTTC
        TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
        ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
        GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

Seq. #33: ch11B7g2

```
1     GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT   50
51    CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTAGTAATTA   100
101   CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAGATAAAATGGAGTGGATGGGA   150
151   TACATAACCTACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAAGTC   200
201   GAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT   250
251   GAACTCTGTAACTTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCTATAACA   300
301   ACCTTT                                              350
351   TATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA   400
401   AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA   450
451   GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG   500
500   GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCT   550
551   TCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT   600
601   GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA   650
651   GATCAC                                              700
701   AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG   750
751   TCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT   800
800   CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT   850
851   GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC   900
901   AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA   950
951   GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC   1000
1001  ACCGTT                                              1050
1051  GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA   1100
1101  ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG   1150
1151  GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG   1200
1200  ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC   1250
1251  CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA   1300
1301  CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
      TACAGC
      AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
      GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
      CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

Seq. #34: ch11D5k

```
1     GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTACATCTCTGGGAG    50
51    ACAGAGTCACCATTACTTGCCGGGCAAGTCAAGACATTGGAAATTATTT   100
```

```
101   AAGCTGGTTCCAACAGAAAGTAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTAT   150
151   GGTGCAATCAAGTTGGCAGTTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGAAGTA   200
201   GGTCTGGATCAGATTATTCTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGA   250
251   TATG                                                300
301   GCGATCTATTACTGTCCACAGTATATACAGTTTCCGCTCACGTTCGGTT   350
351   CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT   400
401   CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT   450
451   GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA   500
500   AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA   550
551   GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG   600
601   AGCAAA                                              650
      GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
      GCCTGAGCTCCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
```

Seq. #35: ch11D5g1

```
1     GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT   50
51    CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA   100
101   CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA   150
151   CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC   200
201   GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT   250
251   GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA   300
301   GCGTTT                                              350
351   GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA   400
401   AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG   450
451   GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG   500
500   GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT   550
551   TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT   600
601   GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG   650
651   AATCAC                                              700
701   AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG   750
751   ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG   800
800   ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC   850
851   TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG   900
901   ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA   950
951   TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG   1000
1001  GTCAGC                                              1050
1051  GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT   1100
1101  GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC   1150
1151  CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA   1200
1200  TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA   1250
1251  AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA   1300
1301  GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
      TCCTTC
      TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
      ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
      GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

Seq. #36: ch11D5g2

```
1       GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCCTCACAGT   50
51      CACTCTCCCTCACCTGTTCTGTCACTGGTTATTCCATCACTAGTAATTA   100
101     CTGGGGCTGGATCCGGAAGTTCCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATTGGA   150
151     CACATAACCAACAGTGGTAACACTACCTACAATCCATCTCTCAAAAGTC   200
201     GAATCTCCATTAGTAGAGACACATCGAGGAATCAGTTCTTCCTGCAGTT   250
251     GAACTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAAAGGA   300
301     GCGTTT                                              350
351     GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACTGTCAGCTCAGCGTCCACCA   400
401     AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGA   450
451     GAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG   500
500     GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCT   550
551     TCCCAGCTGTCCTACAGCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT   600
601     GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA   650
651     GATCAC                                              700
701     AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG   750
751     TCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT   800
800     CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT   850
851     GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC   900
901     AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA   950
951     GCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC   1000
1001    ACCGTT                                              1050
1051    GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA   1100
1101    ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG   1150
```

```
1151  GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG   1200
1200  ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC   1250
1251  CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA   1300
1301  CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC
      TACAGC
      AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
      GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
      CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

Chimerizaion Amino acid sequnces

Seq. #37: 11B7 LC kappa

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

Seq. #38: 11B7-HCgamma1

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

Seq. #39: 11B7 HC gamma2

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

Seq. #40: 11D5 LC kappa

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

Seq. #41: 11D5 HC gamma1

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

Seq. #42: 11D5 HC gamma2

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

Humanization Amino Acid Sequnces

Seq. #43: Hum11B7-VLk:

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

Seq. #44: Hum11B7-VH:

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

Seq. #46: Hum11D5-VLk:

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

Seq. #45: Hum11D5-VH:

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

Humanization nucleotide sequences

Seq. #47: Hum11B7-VLk (427 bp)

```
1     AATTAAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGTGTACCTGCACA    50
51    GCTGTTAGGACTGCTTCTGCTCTGGCTTAGGGGAGCAAGATGCGACATC   100
101   CAGATGACTCAGAGCCCAAGCTCCTTGTCTGCCAGTGTGGGTGATAGGG   150
151   TCACCATAACCTGTCGAGCTTCACAGGATATCGGCAACTACCTACGCTG   200
201   GTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTATGGCGCC   250
251   ACCAATCTGGCTGCTGGTGTTCCCTCTCGGTTCAGTGGGTCTGGATCAG   300
301   GCACAGACTTCACACTCACCATTTCCAGCCTCCAACCCGAGGACTTTGC   350
351   GACGTACTACTGCTTGCAGTCCAAGGAATCCCCTTGGACATTTGGGCAA   400
401   GGGACTAAGGTGGAGATTAAGCGTACGAATTAAAA
```

Seq. #48: Hum11B7-VH (429 bp)

```
1     AATTAAGGTACCAAGCTTGCCACCATGAAGCACCTCTGGTTCTTTCTCC    50
51    TGCTAGTGGCTGCTCCTCGCTGGGTGTTGAGCCAGGTTCAGTTGCAGGA   100
101   ATCTGGACCAGGACTGGTCAAACCCTCTGAGACACTGTCACTGACATGC   150
151   ACT                                                 200
201   GTGTCAGGTGGCTCCATTTCCTCCAACTATTGGGGCTGGATTCGGCAAC   250
251   CTCCGGGAAAAGGGCTTGAGTGGATAGGCTACATCACCTATTCTGGGAG   300
301   TACCTCCTACAATCCCAGTCTTAAGAGCAGGGTGACTATCAGCGTAGAC   350
351   ACC                                                 400
401   TCCAAGAACCAGTTTAGCCTCAAGCTGAGTTCTGTGACTGCAGCGGATA
      CAGCCGTCTACTATTGTGCCAGAACCACGTTCTACTATTGGGGTCAGGG
      CACATTAGTCACCGTTAGCTCAGCGAATTAA
```

Seq. #49: Hum11D5-VLk (427 bp)

```
1     AATTAAAAGCTAGCAAGCTTGCCACCATGGATATGCGCGTCTTAGCCCA    50
51    ACTACTCGGTCTGCTTCTGTTGTGCTTTCCAGGAGCCAGGTGTGACATC   100
101   CAGATGACACAGTCCCCTAGTAGCCTGTCTGCGTCTGTAGGCGATCGAG   150
151   TGA                                                 200
```

```
201  CCATTACCTGCAGAGCTTCCCAGGATATTGGCAACTATCTGAGCTGGTT  250
251  TCAGCAGAAACCAGGCAAAGCACCCAAGAGTCTCATCTATGGGGCCATC  300
301  AAGCTCGCTGTTGGTGTGCCTTCACGGTTTTCCGGATCTGGGTCAGGCA  350
351  CAG                                                400
401  ACTTCACTCTGACCATTTCCAGCCTTCAACCGGAAGACTTCGCAACGTA
     CTACTGTCTGCAGTACATCCAGTTCCCCTTGACTTTCGGTGGAGGGACA
     AAGGTGGAGATAAAGCGTACGAATTAAAA
```

Seq. #50: Hum11D5-VH (429 bp)

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

Primer

SeqID No	Primer:	Sequence
#51	kappa_GSP1	GATGGATGCATTGGTGCAGC
#52	new_kappa_GSP1	ATAGATACAGTTGGTGCAGC
#53	heavy_GSP1	CAGGGTCACCATGGAGTTA
#54	XhoI-hGSP2	CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG
#55	XhoI-kGSP2	CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG
#56	RT-gamma:	GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG
#57	RT-gamma2	GGG CTT GCC GGC CGT G
#58	RT-kappa	TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG
#59	5'Blp	AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT
#60	3 'Bam(GAG):	AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G
#61	5'Bsi:	AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT
#62	3'Bam(CTT):	AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT
#63	VL-11B7-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GGC TCC
#64	VL-11B7-3':	AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TGC CTC
#65	VL-11D5-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GTC TCC ATC
#66	VL-11D5-3':	AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG
#67	VH-11B7/ 11D5-5':	AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA GCT TCA GGA GTC AGG
#68	VH-11B7/ 11D5-3':	AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC TCC TTG GCC
#69	MOUSE1	GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G
#70	MOUSE2	CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G
#71	MOUSE3	GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC
#72	MOUSE4	ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG
#73	CYNO1	AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G
#74	CYNO2	CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C
#75	CYNO3	GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC
#76	CYNO4	ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG

#77	MER1	CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC
#78	MER2	TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C
#79	SKY1	CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC
#80	SKY2	GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG

Leader Squence

Nucleotide Sequence

Seq #81: 1 ATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG TGTGCATTCC 52

Amino Acid Sequence

Seq #82: 1 M G D N D I H F A F L S T G V H S 17

Mouse and Cyno AXL

Seq #83: Cyno AXL nucleotide sequence

```
1     ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTGCT   50
51    TGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCCAGGGGCACACAGGCTGA  100
101   AGAAAGTCCTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCCGGGGA  150
151   CTCACGGGCACCCTTCGGTGTCAGCTCCAGGTTCAGGGAGAGCCCCCCG  200
201   AGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGCGGACAGTAC  250
251   CCAGACCCAGGTGCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGACTGGATAGTG  300
301   GTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCCGACGCGGGACAGT  350
351   ACCAGTGTTTGGTGTTTCTGGGACATCAGAACTTCGTGTCCCAGCCTGG  400
401   CTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGGAGCCTGAGGAC  450
451   AGGACTGTGGCCGCCAACACCCCCTTCAACCTGAGCTGCCAAGCCCAGG  500
501   GACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAGGATGCTGTCCCCCT  550
551   GGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAACCTGCATGTTCCAGGG  600
601   CTGAACAAGACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCCATAACGCCAAGGGAG  650
651   TCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGCTCCCCCAGCAGCCCCG  700
701   TAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGGAGCTGGAGGTGGCTTGG  750
751   ACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCCTGACCCACTGCACCCTGCAGG  800
801   CTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCCAGGCGGGAGAACCAGACCC  850
851   CCCAGAGGAGCCCCTCACCTTGCAAGCATCTGTGCCCCCCCACCAGCTT  900
901   CGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCCCTTATCACATCCGTGTGGCAT  950
951   GCACCAGCAGCCAGGGCCCCTCATCCTGGACACACTGGCTTCCTGTGGA 1000
1001  GACGCCGGAGGGAGTGCCCCTGGGCCCCCCTGAGAACATTAGTGCCACG 1050
1051  CGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTGCATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCC 1100
1101  TGCAGGGTACCCTGTTAGGGTACCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACAC 1150
1151  CCCAGAGGTGCTAATGGACATAGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAG 1200
1201  CTGCAGGGGGACGGGTCTCTGTGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCT 1250
1251  ACACTGCTGCTGGGGATGGACCCTGGAGCCTCCCAGTACCCCTGGAGGC 1300
1301  CTGGCGCCCAGGGCAAGCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAAACT 1350
1351  TCAGCTCCTGCCTTCTCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAG 1400
1401  TCGTGGCCGCTGCCTGTGTCCTCATCTTGGCTCTCTTCCTTGTCCACCG 1450
1451  GCGAAAGAAGGAGACCCGTTATGGAGAAGTGTTCGAGCCAACAGTGGAA 1500
1501  AGAGGTGAACTGGTAGTCAGGTACCGCGTGCGCAAGTCCTACAGTCGCC 1550
1551  GGACCACTGAAGCTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAA 1600
1601  GGAGAAGCTGCGGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGG 1650
1651  AAGACTCTGGGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCA 1700
1701  ACCAGGACGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGC 1750
1751  CATCTGCACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCCTGAGTGAAGCAGTCTGC 1800
1801  ATGAAGGAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTT 1850
1851  TCCAGGGTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTCATCTTACC 1900
1901  TTTCATGAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTT 1950
1951  GGGGACCAGCCAGTGTACCTGCCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGG 2000
2001  CGGACATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTCATACA 2050
2051  CCGGGACCTGGCGGCCAGGAACTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTG 2100
2101  TGTGTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACT 2150
2151  ACCGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGA 2200
2201  GAGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCTTC 2250
2251  GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCAG 2300
2301  GCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGCCT 2350
2351  GAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTCGCGG 2400
```

```
2401  TGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTTACAGAGCTGCGGG  2450
2451  AAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCTCCTGCCCAGGAGCCTGA  2500
2501  CGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTGAACCT  2550
2551  CCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACCCTAAGG  2600
2601  ATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGGACGCTA  2650
2651  TGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGCTGATAGG
      GGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC
```

Seq #84: Cyno AXL amino acid sequence

```
1     MAWPCPFMGRVFLAWCLALCGWVCMAPFGTQAEESPFVGNPGNITGARG   50
51    LTGTLRCQLQVQGEPPEVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV  100
101   VSQLRIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPED  150
151   PTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPG  200
201   LNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAW  250
251   TPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQL  300
301   RLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISAT  350
351   RNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLE  400
401   LQGDGSVSNLTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKET  450
451   SAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVE  500
501   RGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALG  550
551   KTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC  600
601   MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLHSFLLYSRL  650
651   GDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV  700
701   CVADFGLSKKIYNGDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSF  750
751   GVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSR  800
801   CWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEP  850
851   PGAAGGADPPTQLDPKDSCSCLTSAEVHPAGRYVLCPSTTPSPAQPADR  900
      GSPAAPGQEDGA
```

ANTICUERPOS DE AXL

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos monoclonales, los cuales enlazan al dominio extracelular del receptor AXL de tirosina quinasa y los cuales por lo menos parcialmente inhiben la actividad de AXL.

Antecedentes de la invención

El receptor AXL de tirosina quinasa (Ark, UFO, Tyro-7) es un miembro de la familia de quinasas Tyro-3 con los otros miembros que son Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12) y Sky (Rse, Tyro-3, Dtk, Etk, Brt, Tif). Ésta se activa por enlace del ligando heterofílico Gas6, una proteína de 70 kDa homóloga a la proteína S del factor anticoagulación. En contraste a otros receptores de tirosina quinasas, la fosforilación de tirosina AXL puede también ser inducida por enlace homofílico. La activación de AXL lleva a la señalización a través de PI-3-quinasa/Akt (Frannke et al., Oncogene 22: 8983-8998, 2003) y otras trayectorias principales como Ras/Erk y β-catenina/TCF (Goruppi et al., Mol. Cell Biol. 21: 902-915, 2001).

AXL es débilmente expresado en un intervalo de tejidos normales, incluyendo el cerebro, corazón, músculo esquelético, las cápsulas del órgano y tejidos conectivos de varios órganos diferentes, y en monocitos, pero no en los linfocitos. La fosforilación de Akt inducida por AXL ha sido descrita en la sobrevivencia de fibroblastos (Goruppi et al., Mol Cell Biol. 17: 4442-4453 1997), células endoteliales (Hasanbasic et al., Am J Physiol Herat Circ Physiol, 2004), células de músculo liso vasculares (Melaragno et al., J. Mol.

Cell Cardiol. 37: 881-887, 2004) y neuronas (Allen et al., Mol. Endocrinol. 13: 191-201 1999). Adicionalmente, AXL juega un papel en la adhesión celular y la quimiotaxis. La prueba de ratón desnudo de AXL exhiben estabilización dañada de agregados de plaquetas y formación de trombos como un resultado de la activación de la integrina IIb3 de plaquetas.

La sobreexpresión de AXL ha sido demostrada en varios tipos de cáncer, por ejemplo carcinoma de mama (Meric et al., Clin. Cancer Res. 8: 361-367, 2002; Berclaz et al., Ann. Oncol. 12:819-824, 2001), colon (Chen et al., Int. J. Cancer 83 : 579-584, 1999 ; Craven et al., Int. J. Cancer 60 : 791-797, 1995), próstata (Jacob et al., Cancer Detect. Prev. 23 :325-332, 1999), pulmón (Wimmel et al., Eur J Cancer 37: 2264-2274, 2001), gástrico (Wu et al, Anticancer Res 22: 1071-1078, 2002), ovario (Sun et al., Oncology 66: 450-457, 2004), endometrial (Sun et al., Ann. Oncol. 14 : 898-906, 2003), renal (Chung et al., DNA Cell Biol.. 22 : 533-540, 2003), hepatocelular (Tsou et al., Genomics 50 :331-340, 1998), tiroides (lto et al., Thyroid 12 :971-975, 2002 ; lto et al., Thyroid 9 :563-567, 1999), y del esófago (Nemoto et al., 1997), adicionalmente en CML (Janssen et al, A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potencial. Oncogene, 6 : 2113-2120, 1991 ; Braunger et al., Oncogene 14:2619-2631 1997; O´Bryan et al., Mol Cell Biol 11:5016-5031, 1991), AML (Rochlitz et al., Leukemia 13: 1352-1358, 1999), osteosarcoma (Nakano et al., J. Biol. Chem. 270:5702-5705, 2003), melanoma (van Ginkel t al., Cancer Res 64:128-134, 2004) y en carcinoma celular escamosc de la cabeza y cuello (Green et al., Br J Cancer. 2006 94:1446-5, 2006).

Por otra parte AXL ha sido identificado como un gen

asociado a metástasis que es sobreregulado en líneas celulares de cáncer de mama agresivo comparadas con células no invasivas. *In vitro*, se encontró que se requiere la actividad de AXL para migración e invasión, y esta actividad puede ser inhibida por el tratamiento de anticuerpos (solicitud WO04008147). Similarmente, la abrogación de la actividad de AXL in vivo, ya sea por medio de la expresión de la versión negativa dominante de AXL (Vajkoczy, P., et al., Proc. Natl. Acad. Science U.S.A. 103: 5799-5804, 2005) o por regulación descendente mediada por siRNA de AXL (Holland et al., Cancer Res. 65: 9294-9303, 2005) evita el crecimiento celular subcutáneo y ortotópico en experimentos de xenoinjerto de murino.

Hasta ahora se han descrito dos anticuerpos que enlazan a AXL y poseen actividad biológica. Un anticuerpo es capaz de reducir la invasión celular mediada por AXL (solicitud WO04008147) mientras que el otro anticuerpo ha sido reportado para reducir la interacción de AXL/ligando. Sin embargo ambos anticuerpos son policlonales llevándolos a ser no adecuados para administración terapéutica.

De esta forma a la luz del potencial terapéutico de AXL hay una alta necesidad para anticuerpos de AXL monoclonales, fragmentos de anticuerpos o derivados de los mismos que bloqueen efectiva y específicamente la transducción de señal mediada por AXL y los cuales sean adecuados para tratamiento terapéutico.

Por consiguiente un primer aspecto de la presente invención se relaciona a un anticuerpo monoclonal el cual incluye un fragmento o derivado del mismo que enlaza al dominio extracelular de AXL, particularmente de AXL humano, y

por lo menos inhibe parcialmente la actividad de AXL.

Preferentemente el anticuerpo de la presente invención además posee por lo menos una o más de las siguientes propiedades: la capacidad para reducir o bloquear la transducción de señal mediada por AXL, la capacidad para reducir o bloquear la fosforilación de AXL, la capacidad para reducir o bloquear la proliferación celular, la capacidad para reducir o bloquear la angiogénesis, la capacidad para reducir o bloquear la migración de células, la capacidad para reducir o bloquear la metástasis tumoral, la capacidad para reducir o bloquear la señalización de P13K mediada por AXL y la capacidad para reducir o bloquear la anti-apoptosis mediada por AXL, por lo mismo incrementando por ejemplo la sensibilidad de una célula contra tratamiento con un agente antineoplásico. Por otra parte los anticuerpos de la presente invención pueden exhibir alta especificidad para AXL, particularmente AXL humano y no reconocen significativamente otros miembros de familia Tyro-3, por ejemplo MER y/o SKY y/o AXL mamífero no primate, tal como AXL de murino. La especificidad del anticuerpo puede ser determinada por mediciones de reactividad cruzada como se describe en los ejemplos.

El término "actividad" se refiere a la función biológica de AXL, la cual influye el fenotipo de una célula, en particular pero no limita a los fenotipos del cáncer tales como evasión de apoptosis, auto suficiencia en señales de crecimiento, proliferación celular, invasión de tejido y/o metástasis, insensibilidad a las señales anti-crecimiento (anti-apoptosis) y/o angiogénesis sostenida.

El término "transducción de señal mediada por AXL"

significa la activación de trayectorias de mensajeros secundarios accionadas por interacción directa o indirecta de AXL con moléculas de mensajeros secundarios.

El término "fosforilación de AXL" se refiere a la fosforilación de residuos de aminoácidos, preferentemente residuos de tirosina, ya sea por una segunda proteína de AXL (transfosforilación) o por otra proteína la cual tiene actividad de proteína quinasa.

El término "proliferación celular" se refiere a todos los procesos que implican AXL que subyacen a la reproducción de células humanas, en particular pero no limitadas a células cancerígenas humanas. Ellas contribuyen a o resultan en la replicación de ADN celular, separación del ADN duplicado en dos grupos de tamaño igual de cromosomas, y la división física (llamada citocinesis) de células enteras, y pueden ser estimuladas o mediada por actividades no catalíticas o catalíticas de AXL, preferentemente que incluyen fosforilación de AXL y/o transducción de señal mediada por AXL.

El término "angiogénesis" se refiere a todos los procesos que implican AXL que contribuyen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes, en particular pero no limitado a nuevos vasos sanguíneos de suministro de tumor. Estos procesos incluyen múltiples eventos celulares tales como proliferación, sobrevivencia, migración y brote de células endoteliales vasculares, atracción y migración de pericitos así como también formación de membrana basa para estabilización de vasos, perfusión de vasos, o secreción de factores angiogénicos por células estromales o neoplásticas, y deben ser estimulados o mediados por

actividades no catalíticas o catalíticas de AXL, preferentemente incluyendo fosforilación de AXL y/o transducción de señal mediada por AXL.

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

El término "anti-apoptosis mediada por AXL" se refiere a todos los procesos que implican AXL que evitan que las células humanas, preferentemente pero no limitado a celulares cancerígenas humanas la muerte celular programada (apoptosis). En particular, se refiere a procesos que previenen a las células humanas, preferentemente pero no limitadas a células cancerígenas humanas de la inducción de apoptosis a través de la extracción de factor de crecimiento, hipoxia, exposición a agentes quimioterapéuticos o radiación, o inicio de la señalización mediada por el receptor Fas/Apo-1, y se estimulan o median por actividades no catalíticas o catalíticas de AXL, preferentemente que incluyen fosforilación de AXL y/o transducción de señal mediada por AXL.

Además, la presente invención incluye anticuerpos

cuyas actividades de enlace a AXL son $KD=10^{-5}$ M o menos, preferentemente $KD=10^{-7}$ M o menos, y más preferentemente $KD=10^{-9}$ M o menos. Sí la actividad de enlace de un anticuerpo de la presente invención a AXL es $KD=10^{-5}$M o menos puede ser determinada por métodos conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad puede ser determinada usando resonancia de plasmón de superficie con Biacore, y/o por ELISA (ensayos inmunoabsorbentes enlazados a enzima), EIA (inmunoensayos de enzimas), RIA (radioinmunoensayos), o técnicas de anticuerpos fluorescentes, por ejemplo FACS.

En un segundo aspecto, el anticuerpo puede tener por lo menos un sitio de enlace de antígeno, por ejemplo uno o dos sitios de enlace de antígeno. Además, el anticuerpo preferentemente comprende por lo menos una cadena de inmunoglobulina pesada y por lo menos una cadena de inmunoglobulina ligera. Una cadena de inmunoglobulina comprende un dominio variable y opcionalmente un dominio constante. Un dominio variable puede comprender regiones determinantes complementarias (CDR por sus siglas en inglés), por ejemplo una región CDR1, un CDR2 y/o CDR3, y regiones de cuadro. El término "región determinante complementaria" (CDR) está bien definido en la técnica (ver, por ejemplo Harlow and Lane "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbour, 1988) y se refiere a desplegados de aminoácidos dentro de la región variable de un anticuerpo que hace contacto principalmente con el antígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona a un anticuerpo el cual incluye un fragmento o derivado del mismo que enlaza al dominio extracelular de AXL el cual comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos de

cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en las SEQ ID NO: 16, 22, 28 ó una secuencia de CDRH1 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO: 17, 23, 29 ó una secuencia de CDRH2 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en las SEQ ID NO: 18, 24, 30 ó una secuencia CDRH3 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o por lo menos:

una secuencia de aminoácidos de cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en las SEQ ID NO: 13, 19, 25 ó una secuencia CDRL1 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma;

(e) una CDRL2 como se muestra en las SEQ ID NO: 14, 20, 26 ó una secuencia CDRL2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en las SEQ ID NO: 15, 21, 27 ó una secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende una cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO:16 ó una

secuencia CDRH1 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO:17, o una secuencia CDRH2 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:18, o una secuencia CDRH3 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO:13 o una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como se muestra en la SEQ ID NO;14, o una secuencia CDRL2 que difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en SEQ ID NO:15, o una secuencia CDRL3 que difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

o un anticuerpo monoclonal que reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

En una modalidad preferida adicional, el anticuerpo comprende una cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO:22, o una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO:23, o una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:24 ó una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID No 19, o una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como se muestra en la SEQ ID NO:20, o una secuencia CDRL2 la cual difiere de uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO:21 ó una secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

En aún una modalidad adicional preferida, el anticuerpo comprende una cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO:28 ó una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO:29, o una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:30, o una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO:25 o una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como se muestra en la SEQ ID NO: 26, o una secuencia CDRL2 la cual difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO: 27, o una secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a un anticuerpo el cual comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 8, 10, 12 ó por lo menos un dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% de la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 7, 9 11 ó por lo menos un dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o para un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

Como se usa en la presente, "identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptido, indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. Las secuencias de polipéptido preferidas de la invención tienen una identidad de secuencia de por lo menos 90%.

En una modalidad particular preferida, el anticuerpo se selecciona del grupo el cual consiste de 11B7, 11D5, 19D12

o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo de origen natural y/o sintético, por ejemplo un anticuerpo de origen mamífero. Preferentemente, el dominio constante - si está presente- es un dominio constante humano. El dominio variable es preferentemente un dominio variable mamífero, por ejemplo, un dominio variable humanizado o humano. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

El anticuerpo de la invención puede ser del tipo IgA-, IgD, IgE, IgG- o IgM, preferentemente del tipo IgG, o IgM el cual incluye, pero no se limita al tipo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1 y IgM2. En las modalidades más preferidas, el anticuerpo es del tipo IgG1, IgG2 o IgG4 humano.

Como se discute, supra, hay una variedad de isotipos de anticuerpos. Será apreciado que los anticuerpos que son generados no necesitan inicialmente poseer tal isotipo sino, más bien que el anticuerpo puede ser intercambiado a isotipo por usar los genes de región V clonados molecularmente o genes de región constante clonados o ADNc en vectores de expresión apropiadas usando técnicas biológicas moleculares convencionales que son bien conocidas en la técnica y entonces expresar los anticuerpos en células hospedero usando técnicas conocidas en la técnica.

El término anticuerpo incluye "fragmentos" o "derivados", los cuales tienen por lo menos un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab´, fragmentos $F(ab')_2$ así como también fragmentos Fv.

Los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos de cadena sencilla, nanocuerpos y diacuerpos. Los derivados del anticuerpo deben también incluir proteínas de andamiaje las cuales tienen la actividad de enlace similar a anticuerpo que enlazan a AXL.

Dentro del contexto de la presente invención, el término "proteína de andamiaje", como se usa en la presente, significa un polipéptido o proteína con áreas superficiales expuestas en las cuales las inserciones, substituciones o eliminaciones de aminoácidos, son altamente tolerables. Los ejemplos de proteínas de andamiaje que pueden ser usadas de acuerdo con la presente invención son la proteína A de *Staphyloccous aureus*, la proteína de enlace de bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, proteínas de repetición de anquirina, y fibronectina humana (resumido en Binz and Plückthun, Curr Opin Biotechnol, 16: 249-69, 2005). La modificación de una proteína de andamiaje puede ser vista como injerto o integración de una función de afinidad en o sobre el cuadro estructural de una proteína duplicada establemente. La función de afinidad significa una afinidad de enlace de proteína de acuerdo a la presente invención. Una proteína de andamiaje puede ser estructuralmente separable de las secuencias de aminoácidos que confieren la especificidad de enlace. En general, las proteínas las cuales parecen adecuadas para el desarrollo de tales reactivos de afinidad artificial pueden ser obtenidas por técnicas de modificado de proteína racionales, más comunes, combinatoriales tales como panning contra AXL, ya sea proteína purificada o proteína exhibida en la superficie celular, para enlazar agentes en una biblioteca de andamiaje artificial exhibida *in vitro*, las experiencias

son conocidas en la técnica (Skerra, J. Mol. Recog. Biochim Biophys Acta, 1482: 337-350, 2000; Binz and Plückthun, Curr Opin Biotechnol, 16: 459-69, 2005). Además, una proteína de andamiaje la cual tiene una actividad de enlace como anticuerpo puede ser derivada de un polipéptido aceptor el cual contiene el dominio de andamiaje, el cual puede ser injertado con dominios de enlace de un polipéptido donador para conferir la especificidad de enlace del polipéptido donador sobre el dominio de andamiaje que contiene el polipéptido aceptor. Los dominios de enlace insertados pueden incluir, por ejemplo, por lo menos una CDR de un anticuerpo anti-AXL, preferentemente por lo menos una seleccionada del grupo de SEQ ID NO:13-30. La inserción puede ser realizada por varios métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, síntesis de polipéptido, síntesis de ácido nucleico de un aminoácido de codificación así como también por varias formas de métodos recombinantes bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, la especificidad del anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o un derivado del mismo está en la secuencia de aminoácidos de la CDR. El dominio variable (la cadena pesada VH y la cadena ligera VL) de un anticuerpo comprende preferentemente tres regiones determinantes complementarias algunas veces llamadas regiones hipervariables, flanqueadas por cuatro regiones de cuadro relativamente conservadas o "FR". Con frecuencia, la especificidad de un anticuerpo se determina o determina bastante por una CDR, tal como una CDR de la cadena VH o una pluralidad de CDR. La persona experta en la técnica apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo, fragmento

de anticuerpo o derivado del mismo el cual tiene las CDR descritas anteriormente pueden ser usadas para la construcción de anticuerpos de además especificidad y función biológica mejoradas. Hasta ahora, la presente invención comprende anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados del mismo el cual comprende por lo menos una CDR de los dominios variables descritos anteriormente y los cuales tienen ventajosa y substancialmente las mismas propiedades de enlace, similares o mejoradas como el anticuerpo descrito en los ejemplos anexados. A partir de un anticuerpo que comprende por lo menos una CDR como se declara en el listado de secuencia anexo y requerido por las modalidades de la invención, el técnico experto puede combinar además CDR a partir de anticuerpos monoclonales identificados originalmente o diferentes anticuerpos para una especificidad y/o afinidad mejorada. El injerto de CDR es bien conocido en la técnica y puede también ser usado para afinar la afinidad específica y otras propiedades del anticuerpo, fragmento o derivado del mismo de la invención, siempre y cuando la especificidad original es retenida. Es ventajoso que el anticuerpo, fragmento o derivado comprenda por lo menos dos, más preferido por lo menos tres, incluso más preferido por lo menos cuatro o por lo menos cinco y particularmente preferido todas las seis CDR del anticuerpo donador original. En modalidades adicionales de la invención, las CDR de anticuerpos monoclonales originalmente identificados diferentes pueden ser combinados en una nueva entidad de anticuerpo. En estos casos, es preferido que las tres CDR de la cadena pesada se originen del mismo anticuerpo mientras que las tres CDR de la cadena ligera todas se originen de un anticuerpo diferentes (pero todas del mismo).

Los anticuerpos de la presente invención o sus cadenas de inmunoglobulinas correspondientes pueden ser además modificadas usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, por usar eliminación, inserción, substitución, adición y/o recombinación de aminoácidos, y/o cualesquiera otras modificaciones conocidas en la técnica ya sea solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN que subyacen a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para la persona experta en la técnica; ver, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o derivados del mismo son opcionalmente desinmunizados para propósitos terapéuticos. Un anticuerpo desinmunizado es una proteína la cual carece de o está reducida en epítopos que pueden ser reconocidos por los linfocitos auxiliadores T. Un ejemplo de cómo identificar los epítopos es mostrado en Tangri et al., (J Immunol. 174: 3187-96, 2005). La fabricación de fragmentos de anticuerpo desinmunizados o derivados del mismo pueden ser realizados como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,054,297, 5,886,152 y 5,877,293.

En una modalidad los anticuerpos en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es

idéntica con u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). La producción de anticuerpos quiméricos es descrita, por ejemplo, en la solicitud WO 89/09622.

Preferentemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimerizado el cual comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de las SEQ ID NO:38, 39, 41, 42 ó por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 37, 40 ó por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o para un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

En una modalidad adicional los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanizados o totalmente humanizados. Las formas humanizadas de los anticuerpos pueden ser generadas de acuerdo a los métodos conocidos en la técnica tales como la quimerización o injerto de CDR. Los métodos alternativos para la producción de anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y son descritos en, por ejemplo, la Patente europea EP-A1 0 239 400 y la solicitud WO 90/07861.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente la cual no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son con frecuencia referidos como residuos de "importación", los cuales son típicamente tomados de un dominio variable de "importación". La humanización puede ser por ejemplo realizada siguiendo el método de Winter y cotrabajadores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), por substituir CDR o secuencias de CDR de origen no humano por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,816,567) en donde substancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido substituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales los mismos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos FR son substituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos no humanos.

Preferentemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado el cual comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 44, 46 o por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 43, 45 ó por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia

de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o para un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo sobre el domino extracelular de AXL.

Un método para generar anticuerpos totalmente humanos es a través del uso de cepas XenoMouse® de ratones que han sido modificados para contener hasta pero menos de 1000 kb de fragmentos configurados de línea germinal dimensionados del locus de cadena pesada humana y locus de cadena ligera kappa. Ver, Mendez et al., (Nature Genetics 15:146-156, 1997), y Green and Jakobovits, (J. Exp. Med. 188:483-495, 1998). Las cepas XenoMouse® son disponibles de AMGEN, Inc. (inicialmente ABGENIX, Fremont, CA).

La producción de cepas XenoMouse® de ratones es discutido y es delineada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos de Norteamérica No. 07/466,008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610,515, presentada el 8 de Noviembre de 1990, 07/919,297, presentada el 24 de Julio de 1992, 07/922,649 presentada el 30 de Julio de 1992, 08/031,801, presentada el 15 de Marzo de 1993, 08/112,848, presentada el 27 de Agosto de 1993, 08/234,145, presentada el 28 de Abril de 1994, 08/376,279 presentada el 20 de enero de 1995, 08/430, 938, presentada el 27 de abril de 1995, 08/464,584 presentada el 5 de Junio de 1995, 08/464,582, presentada el 5 de Junio de 1995, 08/463,191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462,837 presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486,853 presentada el 5 de Junio de 1995, 08/486,857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486,859 presentada el 5 de junio de 1995, 08/462,513 presentada el 5 de junio de 1995, 08/724,752 presentada el 2 de Octubre de 1996, 08/759,620 presentada el 3 de diciembre de 1996, la publicación de Estados Unidos de Norteamérica

2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001 y las Patentes de Los Estados Unidos de Norteamérica 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181 y 5,939,598 y las Patentes Japonesas No. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Ver, también la Patente Europea No., EP 0 463, 151 B1, publicada concedida el 12 de Junio de 1996, La solicitud de Patente Internacional No. WO9402602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de Patente Internacional No. WO9634096 publicada el 31 de Octubre de 1996, solicitud WO9824893, publicada el 11 de Junio de 1998, solicitud WO0076310, publicada el 21 de Diciembre de 2000. Las descripciones de cada una de las patentes, solicitudes y referencias citadas anteriores, son incorporadas en la presente para referencia en su totalidad.

En un procedimiento alternativo, diferente, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un procedimiento "minilocus". En el procedimiento minilocus, un locus Ig exógeno es imitado a través de la inclusión de piezas (genes individuales) a partir del locus Ig. De esta forma, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH , una región constante mu, y usualmente una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) se forman en una construcción para inserción en un animal. Este procedimiento es descrito en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,545,807 para Surani et al., y Las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299 y 6,255,458 cada una para Lonberg and Kay, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,591,669 y 6,023.010 para Krimpenfort and

Berns, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,612,205, 5,721,367 y 5,789,215 para Berns et al., y la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,643,763 para Chol and Dunn, y la solicitud de Patente de Norteamérica Internacional de GenPharm No. 07/574,748, presentada el 29 de Agosto de 1990, 07/575,962, presentada el 31 de Agosto de 1990, 07/810,279, presentada el 17 de Diciembre de 1991, 07/853,408 presentada el 18 de Marzo de 1992, 07/904,068 presentada el 23 de Junio de 1992, 07/990,860, presentada el 16 de Diciembre de 1992, 08/053,131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096,762 presentada el 22 de Julio de 1993, 08/155,301 presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161,739 presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165,699 presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209,741 presentada el 9 de Marzo de 1994, las descripciones de las cuales son incorporadas en la presente para referencia. Ver, también la Patente Europea No. 0 546 073 B1, las solicitudes de Patente Internacional No. WO9203918, WO9222645, WO9222647, WO9222670, WO9312227, WO9400569, WO9425585, WO9614436, WO9713852 y WO9824884 y la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,981,175 las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

Kirin ha demostrado también la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los cuales, a través de la fusión microcelular, grandes piezas de cromosomas, o cromosomas totales, han sido introducidas. Ver, las solicitudes de Patente Europeas No 773 288 y 843 961, las descripciones de las cuales son incorporadas en la presente para referencia. Adicionalmente, se han generado los ratones KMTM, los cuales son el resultado de reproducción cruzada de

ratones Tc de Kirin con ratones minilocus de Medarex (Humab). Estos ratones poseen el transcromosoma IgH humano de los ratones Kirin y el transgen de cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida et al., Cloning Stem Cells 4:91-102, 2002).

Los anticuerpos humanos pueden también ser derivados por métodos *in vitro*. Los ejemplos adecuados incluyen pero no se limitan a exhibición de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (principalmente Proliferon), Affimed), exhibición de ribosoma (CAT), exhibición de levadura, y similares.

Para propósitos terapéuticos, el anticuerpo puede ser conjugado con un grupo efector terapéutico, por ejemplo, un grupo radioactivo o un grupo citotóxico.

Para los propósitos de diagnóstico, el anticuerpo puede ser etiquetado. Las etiquetas adecuadas incluyen etiquetas radioactivas, etiquetas fluorescentes, o etiquetas de enzima.

Los anticuerpos adicionales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención son así llamados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones es descrito en, por ejemplo, la solicitud WO9110741, WO 9402602, WO 9634096 y WO 9633735.

Como se discute anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab´ y $F(ab')_2$ así como también en cadenas sencillas; ver por ejemplo, WO8809344.

Si se desea, los anticuerpos de la invención pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesadas

y/o ligeras para alterar una propiedad de enlace del anticuerpo. Por ejemplo, una mutación puede ser hecha en una o más regiones CDR para incrementar o disminuir la Kd del anticuerpo para AXL, o alterar la especificidad de enlace del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigida en sitio son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., supra. Adicionalmente, las mutaciones pueden ser hechas en un residuo de aminoácidos que es conocido para ser cambiado comparado con la línea germinal en una región variable de un anticuerpo AXL. En otro aspecto, las mutaciones pueden ser introducidas en una o más regiones de cuadro. Una mutación puede ser hecha en una región de cuadro o dominio constante para incrementar la vida media del anticuerpo AXL. Ver, por ejemplo, la solicitud WO0009560. Una mutación en una región de cuadro o dominio constante puede también ser hecha para alterar la inmunogénicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para enlace covalente o no covalente a otra molécula, o alterar tales propiedades como fijación complemento. Las mutaciones pueden ser hechas en cada una de las regiones de cuadro, el dominio constante y las regiones variables en un anticuerpo mutado sencillo. Alternativamente, las mutaciones pueden ser hechas en solamente una de las regiones de cuadro, las regiones variables o el dominio constante en un anticuerpo mutado sencillo.

En un aspecto adicional, el anticuerpo puede tener un dominio constante con funciones efectoras, en donde las células que expresan AXL las cuales han enlazado al anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo sobre la superficie celular pueden ser atacadas por funciones del

sistema inmunológico. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser capaz de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente a complemento (CDC por sus siglas en inglés). Por otra parte, el anticuerpo puede ser capaz de enlazar a los receptores Fc en las células efectoras, tales como monocitos y células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), y participar en la citotoxicidad celular dependiente a anticuerpo (ADCC por sus siglas en inglés).

En aún un aspecto adicional los anticuerpos de la invención son aplicables para tratamiento terapéutico, preferentemente para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, enfermedades cardiovasculares, en particular arteriosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas a diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética, y particularmente de transtornos asociados con, acompañados por o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL. Las enfermedades hiperproliferativas son seleccionadas preferentemente a partir de trastornos asociados con, acompañados con o provocados por expresión, sobreexpresión, o hiperactividad de AXL, tal como cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer/melanoma de la piel, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, esófago de Barret, y cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer hepático, cáncer de la tiroides, y cáncer de cabeza y cuello o enfermedades hiperplásticas y neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas de expresión o sobreexpresión de AXL.

En otro aspecto los anticuerpos de la presente

invención pueden ser usados para la coadministración con un agente antineoplásico para el tratamiento de uno de los trastornos mencionados anteriormente.

La coadministración como se usa en la presente incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención con un agente antineoplásico, preferentemente un agente antineoplásico el cual induce la apoptosis. El término co-administración además incluye la administración del anticuerpo de la presente invención y el agente antineoplásico, preferentemente el agente antineoplásico el cual induce la apoptosis, en la forma de una sola composición o en la forma de dos o más composiciones distintas. La co-administración incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención con un agente antineoplásico, preferentemente un agente antineoplásico el cual induce la apoptosis simultáneamente (es decir al mismo tiempo) o secuencialmente (es decir en intervalos).

La invención además se relaciona a una molécula de ácido nucleico la cual codifica el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo de la invención. La molécula de ácido nucleico de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente, el fragmento de anticuerpo o derivado del mismo puede ser, por ejemplo ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido sintéticamente o molécula de ácido nucleico quimérico producido recombinantemente la cual comprende cualquiera de aquellas moléculas de ácido nucleico ya sea solas o en combinación. La molécula de ácido nucleico puede también ser ADN genómico que corresponde al gen total o una porción substancial del mismo o a fragmentos y derivados del mismo. La secuencia de nucleótido puede corresponder a la

secuencia de nucleótidos que ocurren naturalmente o pueden contener substituciones, eliminaciones o adiciones de nucleótidos sencillos o múltiples. En una modalidad particular preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Preferentemente, la invención se relaciona a una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo el cual consiste de:

(a) una secuencia de ácido nucleico la cual codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 7-12, 13-30, 37-42, 43-46.

(b) Una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEQ ID NO:1-6, 31-36

(c) Un ácido nucleico complementario para cualquiera de las secuencias en (a) o (b); y

(d) Una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridizar a (a), (b), o (c) bajo condiciones de severidad.

El término "hibridización bajo condiciones de severidad" significa que los dos fragmentos de ácido nucleicos se hibridizan uno con el otro bajo condiciones de hibridización estandarizadas como se describe por ejemplo en Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Tales condiciones son por ejemplo la hibridización en 6.0xSSC en aproximadamente 45°C, seguido por una etapa de lavado con 2.0xSSC en 50°C, preferentemente 2.0xSSC en 65°C, ó 0.2xSSC en 50°C, preferentemente 0.2xSSC en 65°C.

La invención también se relaciona a un vector el cual comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un plásmido, un vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en replicación o defectivos en replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solamente para complementar las células hospedero.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser unidas a un vector el cual contiene marcadores seleccionables para propagación en un hospedero. Generalmente, un vector de plásmido es introducido en un precipitado tal como precipitado de fosfato de calcio o precipitado de cloruro de rubidio, o en un complejo con un lípido cargado o en glomérulos a base de carbono, tales como fullerens. Si el vector sería un virus, este puede ser empacado *in vitro* usando línea celular de empacamiento apropiado antes a la aplicación a las células hospedero.

Preferentemente, el vector de la invención es un vector de expresión en donde la molécula de ácido nucleico es enlazada operativamente a una o más secuencias de control que permiten la transcripción y opcionalmente la expresión en células hospedero procarióticas y/o eucarióticas. La expresión de la molécula de ácido nucleico comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferentemente en un ARNm traducible. Los elementos regulatorios que aseguran la expresión en células eucarióticas, preferentemente células mamíferas, son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Usualmente comprenden secuencias regulatorias que aseguran el inicio de transcripción y opcionalmente señales poliA que aseguran la terminación de transcripción y estabilización de la transcripción. Los elementos regulatorios adicionales pueden incluir mejoradores transcripcionales así

como también traduccionales. Los elementos regulatorios posibles que permiten la expresión en células hospedero procarióticas comprenden, por ejemplo, el promotor lac, trp o tac en *E. coli* y ejemplos para elementos regulatorios que permiten la expresión en células hospedero eucarióticas son el promotor AOXI o GAL1 en levaduras, o el promotor CMV-, SV40-, RSV (virus de sarcoma Rous), incrementador CMV, incrementador SV40 o un intrón de globina en células mamíferas y otras animales. Además de elementos los cuales son responsables para el inicio de transcripción los elementos regulatorios pueden también comprender señales de terminación de transcripción, tales como el sitio SV40-poliA o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. En este contexto, los vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) o pSPORTI (GIBCO BRL). Preferentemente, el vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia u objetivación de gen. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de vacunas, virus adeno asociados, virus de herpes, o virus de papiloma bovino, pueden ser usados para suministro de los polinucleótidos o vector de la invención en la población celular objetivada. Los métodos los cuales son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica pueden ser usados para construir vectores virales recombinantes; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Tercera Edición), N.Y. y Ausubel, Current Protocols en Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, las moléculas de

ácido nucleicos de la invención pueden ser reconstituidas en liposomas para suministro a células objetivas.

La invención además se relaciona a un hospedero el cual comprende el vector de la invención.

El hospedero puede ser una célula procariótica o eucariótica o un animal transgénico no humano. El polinucleótido o vector de la invención el cual está presente en el hospedero puede ser ya sea integrado en el genoma del hospedero o puede ser mantenido extracromósomicamente en el genoma del hospedero o puede ser mantenido extracromosómicamente. En este aspecto, es también entendido que la molécula de ácido nucleico de la invención pueda ser usada para "objetivación del gen" y/o "reemplazo de gen" para restablecer un gen mutante o para crear un gen mutante por medio de la recombinación homóloga; ver por ejemplo Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press.

El hospedero puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica, tal como una bacteria, insecto, hongo, planta, animal, mamífero o preferentemente, célula humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, aquellas del género *Saccharomyces*, en particular aquellas de las especies *S. cerevisiae*. El término "procariótico" significa para incluir todas las bacterias las cuales pueden ser transformadas o transfectadas con un polinucleótido para la expresión de un polipéptido variante de la invención. Los hospederos procarióticos pueden incluir gram negativo así como también bacterias gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli, S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Un polinucleótido el cual codifica para una forma mutante de

polipéptidos variantes de la invención puede ser usado para transformar o transfectar el hospedero usando cualesquiera técnicas comúnmente conocidas para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. Los métodos para preparar genes fusionados, enlazados operablemente y expresarlos en bacterias o células animales son bien conocidas en la técnica (Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001 tercera edición). Las construcciones y métodos genéticos descritos en la presente pueden ser utilizados para expresión de anticuerpos variantes, fragmentos de anticuerpos o derivados de los mismos de la invención en, por ejemplo, hospederos procarióticos. En general, los vectores de expresión los cuales contienen secuencias promotoras los cuales facilitan la transcripción eficiente de la molécula de ácido nucleico insertada son usados en conexión con el hospedero. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, y un terminador, así como también genes específicos los cuales son capaces de proporcionar selección fenotípica de las células transformadas. Los hospederos procarióticos transformados pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivados de acuerdo a técnicas conocidas en la técnica para lograr el crecimiento celular óptimo. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o derivados de los mismos pueden entonces ser aislados del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación de los anticuerpos expresados microbiológicamente o de otra forma expresados, fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos de la invención puede ser por cualesquiera medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas

preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas las cuales implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales.

En una modalidad preferida de la invención, el hospedero es una bacteria, hongo, planta, anfibio o célula animal. Las células animales preferidas incluyen pero no se limitan a células de ovario de hámster Chinas (CHO), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (Cos por sus siglas en inglés), células 3T3, células NSO y un número de líneas celulares diferentes las cuales incluyen células humanas, por ejemplo Per.C6. En otra modalidad preferida, la célula animal es una célula de insecto. Las células de insecto preferidas incluyen pero no se limitan a células de las líneas celulares SF9.

En una modalidad más preferida de la invención, el hospedero es una célula humana o línea celular humana. Las células humanas incluyen, pero no se limitan a células de riñón embriónicas humanas (HEK293, 293T, 293 freestyle). Adicionalmente, las líneas celulares humanas incluyen, pero no se limitan a células HeLa, células de carcinoma hepatocelular humanas (por ejemplo, Hep G2), células A549.

La invención también proporciona los animales no humanos transgénicos los cuales comprenden una o más moléculas de ácido nucleicos de la invención que pueden ser usados para producir los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos pueden ser producidos en y recuperados de tejido o fluidos corporales, tales como leche, sangre u orina, de cabras, vacas, caballos, cerdos, ratas, ratones, conejos, hámsters u otros mamíferos. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,827,690; 5,756,687; 5,750,172; y

5,741,957. Como se describe anteriormente, los animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humano pueden ser producidos por inmunización con AXL o una porción del mismo.

La invención adicionalmente se relaciona a un método para la preparación de un anticuerpo, el cual comprende cultivar el hospedero de la invención bajo condiciones que permiten la síntesis del anticuerpo y recuperar el anticuerpo a partir del cultivo.

Las células transformadas pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivados de acuerdo a técnicas conocidas en la técnica para lograr crecimiento celular óptimo. Una vez expresado, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas inmunoglobulinas de la presente invención, pueden ser purificadas de acuerdo a procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, electroforesis de gel y similares; ver, Scopes, "Protein Purification" Springer-Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o sus cadenas de inmunoglobulinas correspondientes de la invención pueden entonces ser aisladas a partir del medio de crecimiento, lisados celulares, o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación de, por ejemplo, anticuerpos expresados microbiológicamente o cadenas de inmunoglobulinas de la invención pueden ser por cualesquiera medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos por ejemplo contra la

región constante del anticuerpo de la invención.

Será evidente para aquellos expertos en la técnica que los anticuerpos de la invención pueden ser además acoplados a otras porciones por, por ejemplo, aplicaciones de objetivación de fármaco y de imagen. Tal acoplamiento puede ser realizado químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno al sitio de unión o el producto de acoplamiento puede ser modificado en el anticuerpo o antígeno de la invención en el nivel de ADN. Los ADN son entonces expresados en un sistema de hospedero adecuado, y las proteínas expresadas son recolectadas y renaturalizadas, si es necesario.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo es acoplado a un efector, tales como un radioisotopo o un agente quimioterapéutico tóxico. Preferentemente, estos conjugados de anticuerpo son útiles para objetivar células, por ejemplo, células cancerígenas, que expresan AXL, para eliminación. El enlace de anticuerpos/fragmentos de anticuerpos de la invención para radioisótopos por ejemplo proporciona ventajas para tratamientos de tumores. A diferencia de la quimioterapia u otras formas de tratamiento de cáncer,la radioinmunoterapia o la administración de una combinación de radioisotopo-anticuerpo objetiva directamente las células cancerígenas con daño mínimo al tejido normal, saludable circundante. Los radioisotopos preferidos incluyen por ejemplo ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}Ln, ^{125}I, ^{131}I.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden ser usados para tratar el cáncer cuando son conjugados con fármacos quimioterapéuticos tóxicos tales como

geldanamycina (mandler et al., J. Natl. Cancer Instru., 92(19), 1549-51 (2000 y maytansina, por ejemplo, el fármaco maitansinoide, DM1 (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996) y auristatina-E o monometilauristatina-E (Doronina et al., Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003) o caliquemicit); Enlazadores diferentes que liberan los fármacos bajo condiciones ácidas o reductoras o ante exposición a proteasas específicas son empleados con esta tecnología. Los anticuerpos de la invención pueden ser conjugados como se describen el la técnica.

La invención además se relaciona a una composición farmacéutica la cual comprende el anticuerpo, la molécula de ácido nucleico, el vector, el hospedero de la invención o un anticuerpo obtenido por el método de la invención.

El término "composición" como se emplea en la presente comprende por lo menos un compuesto de la invención. Preferentemente, tal composición es una composición farmacéutica o de diagnóstico.

Es preferido que la composición farmacéutica comprenda un portador y/o diluyente aceptable farmacéuticamente. La composición farmacéutica descrita en la presente puede ser parcialmente útil para el tratamiento de trastornos asociados con, acompañados por o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL, por ejemplo enfermedades hiperproliferativas, enfermedades cardiovasculares, en particular arteroscleroSis y trombosis, enfermedades relacionadas a diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética. Tales trastornos comprenden, pero no se limitan a cáncer, por ejemplo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón,

cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer de la piel/melanoma, glioblastoma, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de esófago y esofágico de Barrett, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer hepático, cáncer de la tiroides, y cáncer de cabeza y cuello, u otras enfermedades hiperplásticas o neoplásticas u otras enfermedades de expresión o sobreexpresión de AXL.

El término "hiperactividad" en la presente se refiere a señalización de AXL no controlada la cual puede ser provocada por una carencia y/o disfunción de regulación negativa. Por la forma de ejemplo la regulación negativa comprende desfosforilación de proteína, degradación y/o endocitosis. Por otra parte la señalización de AXL no controlada puede ser el resultado de alteraciones genéticas, ya sea somáticas o de línea germinal, lo cual resulta en cambios de la secuencia de aminoácidos de AXL.

Ejemplos de portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones las cuales comprenden tales portadores pueden ser formuladas por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede ser efectuada por formas diferentes, por ejemplo por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal, o intrabronquial. Las composiciones de la invención pueden

también ser administradas directamente al sitio objetivo, por ejemplo, por suministro biolístico a un sitio objetivo externo o interno, como el cerebro. El regimen de dosis será determinado por el médico que atiende y los factores físicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, los cuales incluyen el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular a ser administrado, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que son administrados concurrentemente. La materia activa proteinácea farmacéuticamente puede estar presente en cantidades entre 1 µg y 100 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, las dosis abajo o arriba de este intervalo de ejemplo son previstos, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Si el régimen es una infusión continua, debe también estar en el intervalo de 1 pg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

El progreso puede ser monitoreado por evaluación periódica. Las composiciones de la invención pueden ser administradas local o sistémicamente. Las preparaciones para administración parental incluyen las soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parentales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites fijos o de

Ringers lactados. Los vehículos intravenosos incluyen fluido y agotadores de nutrientes, agotadores de electrolitos (tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer), y similares. Los conservadores y otros aditivos pueden también estar presentes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender además agentes que dependen del uso propuesto de la composición farmacéutica. Es particularmente preferido que la composición farmacéutica comprenda agentes activos adicionales como, por ejemplo un agente antioneoplástico adicional, inhibidor de molécula pequeña, agente antitumoral o agente quimioterapéutico.

La invención también se relaciona a una composición farmacéutica la cual comprende un anticuerpo anti-AXL, el cual es preferentemente el anticuerpo de la invención en combinación con por lo menos un agente antineoplásico adicional. La combinación es efectiva, por ejemplo, para inhibir el crecimiento celular anormal.

Muchos agentes antineoplásicos son conocidos actualmente en la técnica. En general el término incluye todos los agentes que son capaces de prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos hiperproliferativos. En una modalidad, el agente antineoplásico es seleccionado del grupo de proteínas terapéuticas las cuales incluyen pero no se limitan a anticuerpos o proteínas inmunomodulatorias. En otra modalidad el agente antineoplásico es seleccionado del grupo de inhibidores de molécula pequeña o agentes quimioterapéuticos los cuales consisten de inhibidores mitóticos, inhibidores de quinasa, agentes alquilantes, anti-

metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores de factor de crecimiento, inhibidores de ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de deacetilasa de histona, agentes antisobrevivencia, modificadores de respuesta biológica, antihormonas, por ejemplo, anti-andrógenos, y agentes antiangiogenesis.

Los ejemplos específicos de agentes antineoplásicos los cuales pueden ser usados en combinación con los anticuerpos proporcionados en la presente incluyen, por ejemplo, gefitinib, lapatinib, sunitinib, pemetrexed, bevacisumab, cetuximab, imatinib, trastuzumab, alemtuzumab, rituximab, erlotinib, bortezomib y similares. Otros agentes antineoplásicos específicos a ser usados en las composiciones como se describe y reclama en la presente incluyen por ejemplo, agentes quimioterapéuticos tales como capecitabina, daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosurea, busulfan, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifen, dacarbazina, procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucil, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-azacitidina, hidroxiurea, deoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosfor-amida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodeoxiuridina (5-FudR), metotrexato (MTX por sus siglas en inglés), colquicina, taxol, vincristina, binblastina, etopósido, trimetrexato, teniposido, cisplatina, y dietilestilbestrol (DES). Ver, generalmente, The Merck Manual

of Diagnosis and Therapy, 15ª edición, 1987, pág. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. En particular preferidos son tales antineoplásicos que inducen la apoptosis.

Cuando se usa con los anticuerpos AXL descritos, tales agentes antineoplásicos pueden ser usados individualmente (por ejemplo, 5-FU y un anticuerpo), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y un anticuerpo por un periodo de tiempo seguido por MTX y un anticuerpo), o en combinación con uno o más de otros agentes antineoplásicos (por ejemplo, 5-FU, MTX y un anticuerpo, o 5-FU, radioterapia y un anticuerpo).

El término agente antineoplásico puede también incluir procedimientos terapéuticos, como por ejemplo radiación o radioterapia.

La composición farmacéutica de la invención puede ser usada en medicina humana y puede ser usada también para propósitos veterinarios.

Adicionalmente, la invención se relaciona al uso del anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico, el vector, el hospedero de la invención o un anticuerpo obtenido por el método de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades hiperproliferaivas, enfermedades cardiovasculares, en particular arterosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas a diabetes, en particular hipertrofia glomerular o nefropatía diabética, y particularmente de trastornos asociados con, acompañados por o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL.

Una enfermedad hiperproliferativa como se menciona

anteriormente incluye cualesquiera neoplasia, es decir cualquier crecimiento nuevo anormal y/o no controlado de tejido. El término "crecimiento nuevo no controlado de tejido" como se usa en la presente puede depender de una disfunción y/o pérdida de regulación de crecimiento. Una enfermedad hiperproliferativa incluye enfermedades tumorales y/o cáncer, tales como cánceres metastásicos o invasivos.

En una modalidad preferida del uso de la invención, la enfermedad hiperproliferativa es en particular cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia de mieloide, cáncer de piel/melanoma, glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de esófago y esofágico de Barret, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de la tiroides, y cáncer de cabeza y cuello, o enfermedades hiperplásticas o neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas que expresan o sobre expresan AXL.

En aún otra modalidad la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti AXL, preferentemente el anticuerpo de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente antineoplásico para el tratamiento de uno de los trastornos mencionados anteriormente en la presente.

De acuerdo a una modalidad adicionalmente preferida la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer resistente a fármaco. En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal como se define en las

reivindicaciones 1-22.

Además la presente invención se relaciona a una composición de diagnóstico la cual comprende el anticuerpo de la invención, la molécula de ácido nucleico, el vector, el hospedero de la invención o un anticuerpo obtenido por el método de la invención y opcionalmente un portador aceptable farmacéuticamente.

La composición de diagnóstico de la invención es útil en la detección de una expresión, sobreexpresión o hiperactividad no deseada de AXL de mamífero en diferentes células, tejidos u otra muestra adecuada, lo cual comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo de la invención, y detectar la presencia de AXL en la muestra. Por consiguiente, la composición de diagnóstico de la invención puede ser usada para evaluar el inicio o el estado de enfermedad de una enfermedad hiperproliferativa.

Adicionalmente, las células malignas, tales como células de cáncer que expresan AXL, pueden ser objetivadas con el anticuerpo de la invención. Las células las cuales han enlazado el anticuerpo de la invención pueden de esta forma ser atacadas por funciones del sistema inmunológico tal como el sistema de complemento o por citotoxicidad mediada por células, por lo mismo reduciendo el número de o erradicando las células cancerígenas. Estas consideraciones igualmente aplican al tratamiento de metástasis y tumores recurrentes.

En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo de la invención es acoplada a un grupo de etiquetado. Tales anticuerpos son particularmente adecuados para aplicaciones de diagnóstico. Como se usa en la presente, el término "grupo de etiquetado" se refiere a un marcador

detectable, por ejemplo un aminoácido radioetiquetado o porciones de biotinilo que pueden ser detectadas por la avidina marcada. Varios métodos para etiquetar polipéptidos y glicoproteínas, tales como anticuerpos, son conocidos en la técnica y pueden ser usados para realizar la presente invención. Ejemplos de grupos de etiquetado adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisotopos o radionuclidos (por ejemplo; ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), grupos fluorescentes (por ejemplo FITC, rodamina, fósforos de lantanida), grupos enzimáticos (por ejemplo peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos de biotinilo, o epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportador secundario (por ejemplo secuencias de pares de cierre de leucina, sitios de enlace para anticuerpos secundarios, dominios de enlace de metal, etiquetas de epítopo).

En ciertos aspectos, puede ser deseable, que los grupos de etiquetado sean unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir la impedancia estérica potencial.

En otra modalidad la presente invención se relaciona a un método para evaluar la presencia de células que expresan AXL el cual comprende poner en contacto el anticuerpo de la invención con células o un tejido que se sospecha de portar AXL en su superficie. Los métodos adecuados para detección de expresión de AXL en una muestra puede ser un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés) o una inmunohistoquímica (IHC por sus siglas en inglés).

Un ensayo de ELISA puede ser realizado en un formato de placa de microtítulo, en donde por ejemplo los pozos de una placa de microtítulo, son adsorbidos con un anticuerpo AXL. Los pozos son enjuagados y tratados con un agente de bloqueo tal como una proteína de leche o albúmina para evitar la adsorpción no específica del analito. Subsecuentemente los pozos son tratados con una muestra de prueba. Después de enjuagar la muestra de prueba o estándar, los pozos son tratados con un segundo anticuerpo AXL que es etiquetado, por ejemplo por conjugación con biotina. Después de lavar en exceso el anticuerpo secundario, se detecta la etiqueta, por ejemplo con peroxidasa de rábano conjugada a avidina (HRP por sus siglas en inglés) y un substrato cromogénico adecuado. La concentración del antígeno de AXL en las muestras de prueba es determinada por comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

Para IHC, los tejidos embebidos a parafina pueden ser usados, en donde los tejidos son, por ejemplo primero desparafinizados en xileno y entonces deshidratados, por ejemplo con etanol y enjuagados en agua destilada. Los epítopos antigénicos enmascarados por fijación de formalina y embebidos en parafina pueden ser expuestos por enmascarado de epítopo, digestión enzimática o saponina. Para enmascaramiento de epítopo pueden ser calentadas las secciones de parafina en un vaporizador, baño de agua u horno de microondas por 20-40 minutos en una solución de recuperación de epítopo como por ejemplo solución de HCl 2N (pH 1.0). En el caso de una digestión de enzimas, las secciones de tejido pueden ser incubadas en 37°C por 10-30 minutos en diferentes soluciones de enzimas tales como proteinasa K, tripsina, pronasa,

pepsina, etc.

Después de enjuagar la solución de recuperación de epítopo o exceso de enzima, las secciones de tejido son tratadas con un amortiguador de bloqueo para evitar las interacciones no específicas. El anticuerpo AXL primario es agregado en concentraciones apropiadas. El anticuerpo primario en exceso es enjuagado y las secciones son incubadas en solución de bloqueo de peroxidasa por 10 minutos en temperatura ambiente. Después de otra etapa de lavado, las secciones de tejido son incubadas con un anticuerpo etiquetado secundario, por ejemplo etiquetado con un grupo que puede servir como un anclaje para una enzima. Los ejemplos por lo tanto son anticuerpos secundarios etiquetados con biotina que son reconocidos por peroxidasa de rábano acoplado a estreptavidina. La detección del complejo de anticuerpo/enzima es lograda por incubar con un substrato cromogénico adecuado.

En una modalidad adicional la presente invención se relaciona a un método para bloquear la función de AXL el cual comprende poner en contacto el anticuerpo de la invención con células o un tejido el cual se sospecha porta AXL en su superficie bajo condiciones, en donde el anticuerpo es capaz de bloquear la función AXL. El poner en contacto puede ser *in vitro* o in vivo.

La invención también se relaciona a un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa, enfermedades cardiovasculares, en particular arterosclerosis y trombosis, enfermedades relacionadas a diabetes, en particular hipertrofia gromerular o nefropatía diabética, el cual comprende, administrar a un paciente en necesidad del mismo una dosis adecuada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o

derivado del mismo de la presente invención. La enfermedad hiperproliferativa es preferentemente seleccionada de trastornos asociados con, acompañados por o provocados por expresión, sobreexpresión o hiperactividad de AXL, tal como cáncer, por ejemplo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, linfoma folicular, leucemia mieloide, cáncer/melanoma de la piel, glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de esófago y esofágico de Barret, cáncer del estómago, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, y cáncer de cabeza y cuello, o enfermedades hiperplásticas y neoplásticas u otras enfermedades hiperproliferativas de expresión o sobreexpresión de AXL.

De acuerdo a otra modalidad preferida de la invención el cáncer a ser tratado es un cáncer resistente a fármaco.

La invención además se relaciona a un método para tratar una enfermedad en donde el anticuerpo de la invención es administrado a un mamífero y en donde la enfermedad es correlacionada directa o indirectamente con el nivel anormal de expresión o actividad de AXL.

Finalmente, la invención se relaciona a un kit el cual comprende un anticuerpo anti-AXL, preferentemente el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo de la invención, la molécula de ácido nucleico la cual codifica los componentes y/o el vector de la invención.

Todas las modalidades que cubren los compuestos descritos en la presente pueden ser usadas como compuestos sencillos o en combinación para la

preparación de un medicamento.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1B son el análisis de citometría de flujo de la superficie celular AXL en fibroblastos Rati-Mock y Rati-AXL cl.2 Las células cl.2 Ratl-Mock policlonales y RATl-AXL clonales, generadas por infección de fibroblastos de Ratl con virus ecotrófico pLXSN y pLXSN-hAXL, respectivamente, son recolectados y teñidos con anticuerpo de control de ratón 72A1 (figura 1A) o anticuerpo primario MAB154 anti-AXL de ratón (figura 1B) en 3 µg/ml y anticuerpo secundario antiratón conjugado a PE. Ver el texto para detalles. La tinción de las células cl.2 Ratl-AXL resulta en un cambio por tres órdenes de magnitud y demuestra la sobreexpresión de AXL sobre la superficie de estas células.

Las Figuras 2A-2B son el análisis de citometría de flujo de AXL de superficie celular en fibroblastos cl.7 de NIH3T3-Mock y NIH3T3-AXL. Las células cl.7 NIH3T3-Mock policlonales y NIH3T3-AXL clonales, generadas por infección de fibroblastos NIH3T3 con virus ecotrófico pLXSN y pLSN-AXL, respectivamente, son recolectadas y teñidas con anticuerpo de control de ratón 72A1 (figura 2A) o anticuerpo primario MAB154 anti-AXL de ratón (figura 2B) en 3 µg/ml y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a PE. Ver texto para detalles. La tinción de células NIH3T3-AXL cl.7 resulta en un cambio por dos órdenes de magnitud y demuestra la sobreexpresión AXL sobre la superficie de estas células.

La Figura 3 muestra el análisis de citometría de flujo de reactividad cruzada de anticuerpos antiAXL de rata con AXL de ratón y mono cinomolgus así como también Mer y Sky humano. Los fibroblastos HEK293T son transfectados

temporalmente con pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer, o pcDNA3-hSky. Las células son recolectadas y teñidas con 10 µg/ml de 1D5 anticuerpo primario anti-AXL, 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7, 12B7 y/o anticuerpo secundario anti rata de burro conjugado a PE, o anticuerpo secundario antiratón de burro conjugado a PE solamente para control. Ver el texto para detalles. Excepto 12B7 el cual muestra reactividad cruzada moderada con AXL de ratón así como también Mer y SKy humano, ninguno de los anticuerpos anti-AXL reacciona con cruce con estas moléculas. En contraste, todos los anticuerpo anti-AXL probados reaccionan en forma cruzada con AXL de mono cynomolgus.

Las Figuras 4A-4B muestran los experimentos para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en fosforilación del receptor AXL. Los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (figura 4A) y células de cáncer de pulmón NCI-H292 (figura 4B) son cosechadas, preincubadas con 10 µg/ml de anticuerpo de control de ratón 72A1 así como también los anticuerpos anti-AXL de rata 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7 o 10D12, tratados con o sin 400 ng/ml de mGas6, y lisados. Los lisados son transferidos a anticuerpo anti-fosfotirosina recubiertos con 4G10 en placas de 96 pozos Maxi-Sorp, las cuales son entonces lavadas e incubadas con 0.5 µg/ml de anticuerpo 12B7 anti-AXL de rata bioestañada 12B7, estreptavidina conjugada a AP y solución de substrato AttoPhos con el fin de recolectar las intensidades de fluorescencia. Ver el texto para detalles. Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7, 11D5, 6E7 y 10D12 son capaces de bloquear o reducir la activación de AXL mediada por ligando como se indica por fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados

anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, los anticuerpos anti-AXL de rata 2A1 y 11D7 estimulan la activación de AXL basal como se indica por fosforilación incrementada, no reducen significativamente la activación de AXL mediada por ligando y son por lo tanto considerados anticuerpos anti-AXL agonistas.

La Figura 5 muestra los experimentos de ELISA para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en fosforilación de MAP-quinasa p42/p44. las células de cáncer del cuello del útero CaSki son cosechadas, preincubadas con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotípico 1D5 así como también los anticuerpos anti-AXL de rata 11D5, 11B7 ó 2A1, tratados con o sin 400 ng/ml mGAs6, y fijos con formaldehído. Las células son lavadas, detenidas e incubadas con anticuerpo primario MAP quinasa anti-fosfo-p44/p42 (Thr202/Tyr204), anticuerpo secundario anti conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina con el fin de medir las intensidades de absorbancia. Ver el texto para detalles. Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 son capaces de reducir la activación de MAP-quinasa p42/p44 mediada por ligandos como se indica por la fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo 2A1 anti-AXL de rata estimula la activación de MAP-quinasa p42/p44 basal como se indica por la fosforilación incrementada, ni reduce la activación de MAP-quinasa p42/p44 mediada por ligando, y es por lo tanto considerada un anticuerpo anti-AXL agonista.

Las Figuras 6A-6B muestran experimentos de ELISA para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en fosforilación Akt-quinasa. Los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7

(figura 6A) y las células cancerígenas de pulmón CaLu-1 (figura 6B) son cosechados, preincubados con 10 µg/ml del anticuerpo 1D5 de control isotípico así como también los anticuerpos anti-AXL de rata 11D5, 11B7, ó 2A1, tratados con o sin 400 ng/ml de mGas6, y se fijan con formaldehído. Las células son lavadas, detenidas e incubadas con anticuerpo primario anti-fosfo-Akt (Ser473), anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina con el fin de medir las intensidades de absorbancia. Ver el texto para detalles. Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 son capaces de bloquear o reducir la activación de Akt-quinasa mediada por ligando como se indica por fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo anti-AXL de rata 2A1 estimula la activación de Akt-quinasa basal como se indica por la fosforilación incrementada, ni reduce la activación de Akt-quinasa mediada por ligando y es por lo tanto considerada un anticuerpo anti-AXL agonista.

La Figura 7 muestra los experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata y quiméricos en fosforilación Akt-quinasa. Se cosechan los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7, preincubados con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml y 1 µg/ml de anticuerpo anti-AXL de rata 11B7 o anticuerpo ch11B7 anti-AXL quimérico, así como también 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo 11D5 anti-AXL de rata o anticuerpo ch11D5 anti-AXL quimérico, tratada con o sin 400 ng/ml mGas6, y se fija con formaldehído. Las células son lavadas, detenidas e incubadas con anticuerpo primario anti fosfo-Akt (Ser473), anticuerpo secundario anti-conejo

conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina con el fin de medir las intensidades de absorbancia. Ver los textos para detalles. El anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata y anticuerpo anti-AXL quimérico ch11B7 así como anticuerpo 11D5 anti-AXL de rata ó anticuerpo anti-AXL quimérico ch11D5 son capaces de inhibir la activación de Akt-quinasa mediada por ligando a un grado similar como se indica por la fosforilación disminuida. De esta forma, como se compara con sus contrapartes de rata respectivos, los anticuerpos ch11B7 y ch11D5 anti-AXL quimérico mantienen la actividad.

La Figura 8 muestra los experimentos de ELISA de competición para investigar las propiedades de enlace de anticuerpos anti-AXL de rata. Las placas Maxi-Sorp de 96 pozos son recubiertas con 1 µg/ml de AXL-ECD humano y se preincuban con 10 µg/ml de anticuerpo 1D5 de control isotípico no bioestañado ó anticuerpos 11B7 anti-AXL de rata, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 ó 2A1. Después de la incubación con 0.5 µg/ml de anticuerpo 1D5 de control isotípico bioestañado o anticuerpos 11B7 anti-AXL de rata bioestañados, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, ó 2A1 y adición de solución de substrato de Streptavidina y AttoPhos conjugado a AP, se recolecta la fluorescencia para medir los anticuerpos bioestañados enlazados. Ver el texto para detalles. El anticuerpo de control 1D5 no enlaza a AXL-ECD. Los anticuerpos anti-AXL antagonistas 11B7, 11D5, 6E7 y 10D12 compiten entre sí para los mismos epítopos o adyacentes estructuralmente. Los anticuerpos agonistas 11D7 y 2A1 reconocen diferentes epítopos y no compiten con los anticuerpos antagonistas para enlace al AXL-ECD.

La Figura 9 muestra el ensayo de curación de herida/rasguño para investigar los efectos de anticuerpos

anti-AXL de rata y quiméricos en la migración y proliferación celular. Después del crecimiento para confluencia, las células de cáncer de pulmón NCI-H292 son cosechadas y se hacen pequeños agujeros con la punta de una pipeta. En la presencia de 10 µg/ml del anticuerpo 1D5 de control isotípico, los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11D5, 11B7, 6E7 ó 10D12, los anticuerpos chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2 anti-AXL quiméricos, los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata agonistas, así como también 10 µg/ml de Erbitux o 5 µM de Sutent, se permite que las células repoblen el espacio hecho anteriormente. Después de 24 horas, las células son fijadas y teñidas, y se toman fotos del orificio hecho con la pipeta. Ver el texto para detalles. Comparados con el anticuerpo 1D5 de control isotípico, los anticuerpos 11D5, 11B7, 6E7 y 10D12 anti-AXL de rata antagonistas, así como también los anticuerpos anti-AXL quiméricos chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2 reducen la repoblación del espacio, mientras que los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata agonistas llevan al cierre completo del espacio.

La Figura 10 muestra el ensayo de cámara Boyden/transpozo para investigar los efectos de los anticuerpos anti-AXL de rata en migración celular dirigida. Los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 cosechados en suero son pre-incubados con 10 µg/ml de los anticuerpos anti-AXL de rata 4A6, 11B7 ó 2A1, colocados en placas en la parte superior de insertos de FluoreBlock recubiertos con colágeno I y expuestos a medio libre de suero con o sin Gas6 en el compartimiento inferior. Después de 7 horas, se tiñen las células transmigradas con calcein-AM y se mide la fluorescencia de cada pozo. Ver texto para conocer detalles.

El anticuerpo anti-AXL antagonista 11B7 reduce la migración inducida por Gas6 y basal de fibroblastos NIH3T3-AXL, mientras el anticuerpo 2A1 anti-AXL de rata agonista incrementa la migración inducida por ligando, y en partícula basal de las células NIH3T3-AXL. El anticuerpo 4A6 no afecta la migración celular dirigida.

La Figura 11 muestra el ensayo de AlamarBlue™ para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en proliferación celular inducida por Gas6. Los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 cosechados en suero son preincubados con 20 µg/ml del anticuerpo 72A1 de control de ratón, los anticuerpos 11D5 y 11B7 anti-AXL antagonistas de rata, así como también el anticuerpo 2A1 anti-AXL agonista, y se hace crecer en la ausencia o presencia de 400 ng/ml de Gas6. Después de 4 días, se agrega AlamarBlue™ a las células y se mide la absorbancia. Ver el texto para detalles. Los anticuerpos 11D5 y 11B7 anti-AXL antagonistas inhiben la proliferación inducida por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7, mientras que el anticuerpo anti-AXL de rata agonista incrementa la proliferación inducida por ligando y, en particular basal de las células NIH3T3-AXL cl.7.

La Figura 12 muestra el ensayo de caspase-3/7 para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en anti-apoptosis mediada por Gas6. Los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 cosechados con suero son preincubados con 10 µg/ml del anticuerpo 1D5 de control isotípico, los anticuerpos 11B7 y 11D5 anti-AXL de rata antagonista o los anticuerpos 11D7 y 2A1 anti-AXL de rata agonistas y tratados con o sin Gas6. Se agrega una solución de substrato Apo-ONE y se recolecta la fluorescencia para medir la actividad de caspase-3/7. Ver el texto para detalles. Comparado con el anticuerpo de control

isotípico, los anticuerpos 11B7 y 11D5 anti-AXL de rata antagonistas reduce la anti-apoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos de NIH3T3-AXL cl.7 cosechada por suero y de esta forma induce la apoptosis. En contraste, los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata agonistas inducen la anti-apoptosis de células NIH3T3-AXL cl.7 cosechadas por suero independientemente de la ausencia o presencia de Gas6, y por lo tanto inhibe la apoptosis.

Las Figuras 13A(a)-13B(b) muestran el ensayo de angiogénesis celular a base de esferoides para investigar los efectos de los anticuerpos anti-AXL de rata en brotes celulares endoteliales inducidos por VEGF-A. Los esferoides HUVEC son embebidos en un gel de colágeno 3D, estimulado con 25 ng/ml de VEGF-A y se tratan con concentraciones indicadas de los anticuerpos anti-AXl antagonistas 11B7 (figura 13A(a)-13A(b)) y 11D5 (figura 13B(a)-13B(b)) por 24 horas. La media $\pm$ SEM de la longitud de brote acumulado de 10 esferoides seleccionados aleatoriamente por punto de datos se analiza (figura 13A(a)-13A(b)) y se determina la inhibición relativa del anticuerpo (figura 13B(a)-13B(b)). La fijación de las curvas IC_{50} y el cálculo de valores IC_{50} se realiza con GraphPad Prism 4.03. Ver el texto para detalles. Los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11B7 y 11D5 inhiben el brote HUVEC estimulado por VEGF-A en el ensayo de angiogénesis a base de esferoides en una forma dependiente a dosis. Mientras que el tratamiento con la concentración más alta de brote HUVEC reduce 11B7 a niveles basales, la inhibición con la concentración más alta de 11D5 no es tan efectiva (figura 13A(a)-13A(b)). Se inhibe el brote HUVEC con valores IC_{50} de 9.8×10^{-8} M y 7.0×10^{-7} M por 11B7 y 11D5,

respectivamente (figura 13B(a)-13B(b)).

La Figura 14 muestra el modelo xenoinjerto ortotópico para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en crecimiento de carcinoma de próstata humano en ratones desnudos. Las células de carcinoma de próstata PC-3-LN son implantadas ortotópicamente en la próstata de ratones NMRI$^{-un/un}$. Los animales son agrupados al azar en 4 grupos y reciben 25 mg/kg del anticuerpo 1D5 de control isotípico o el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista, así como también 40 mg/kg de Sutent ó 12.5 mg/kg de Taxotere. Durante el periodo de tratamiento, el crecimiento de tumores PC-3-LN que crecen ortotópicamente así como también la metástasis periférica es monitoreada una vez semanalmente por medio de captar la imagen de bioluminiscencia in vivo en el día 15, día 23, día 29 y día 34. Ver texto para detalles. Comparados con el anticuerpo 1D5 de control isotípico, el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista reduce el crecimiento total de tumores de próstata PC-3-LN en ratones desnudos.

La Figura 15 muestra el modelo de xenoinjerto ortotópico para investigar los efectos de anticuerpos anti-AXL de rata en metástasis de carcinoma de próstata humano en ratones desnudos. Las células de carcinoma de próstata PC-3-LN se implantan ortotópicamente en los ratones NMRI$^{-un/un}$. Los animales son agrupados al azar en 4 grupos y reciben 25 mg/kg del anticuerpo 1D5 de control isotípico o el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista, así como también 40 mg/kg de Sutent ó 12.5 mg/kg de Taxotere. Después de la necropsia, son recolectados y analizados órganos seleccionados (hígado, bazo, pulmón, fémur y una parte de la espina lumbar) para la presencia de metástasis por medio de la imagen de

bioluminiscencia. Ver el texto para detalles. Comparado con el anticuerpo 1D5 de control isotípico, el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista de la invención reduce la ocurrencia de metástasis de bazo. De particular interés, el efecto anti-metastásico de 11B7 en este experimento es más fuerte que aquel de Sutent.

Las Figuras 16A-16B muestran el análisis inmunohistoquímico de expresión de AXL en diferentes malignidades humanas. 17 tipos de tumor sólido humano, cada uno representado por pares de tejido de tumor y acoplamiento de tejido no maligno, se analizan con respecto a la expresión AXL por inmunohistoquímica. Ver el texto para detalles. Se resumen los resultados como (figura 16A), donde una intensidad de 1 se refiere a tinción débil en más de 25% de células inspeccionadas. Ejemplos de tinción más intensa como se observa en tumores malignos y un carcinoma de célula de anillo de sello del estómago son exhibidos (figura 16B).

Las Figuras 17A-17B muestran los experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos anti-AXL quiméricos y de rata en fosforilación Axl. Las células de cáncer del cuello del útero CaSki son cosechadas, preincubadas con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/l, 1 µg/ml, y 10 µg/ml de anticuerpo anti-Axl de rata 11B7 (figura 17A) o anticuerpo ch11B7 anti-Axl quimérico (figura 17B), tratado con o sin 400 ng/ml de mGas6, y sometidos a lisis. Los lisados son transferidos a placas de 96 pozos Maxi-Sorp recubiertos con anticuerpo 4G10 anti-fosfo-tirosina. Después de esto, se lavan las placas y se incuban con 0.5 µg/ml de anticuerpo 12B7 anti-Axl de rata bioestañado, estreptavidina conjugado a AP, y solución de substrato AttoPhos con el fin de recolectar las

intensidades de fluorescencia. Ver texto para detalles. Como se demuestra por la disminución dependiente a concentración de la fosforilación de Axl relativa en la línea celular de cáncer del cuello del útero CaSki, el anticuerpo 11B7 anti-Axl de rata (figura 17A) y el anticuerpo anti-Axl ch11B7 quimérico (figura 17B) de la invención son capaces de bloquear la activación inducida por ligando de la tirosina quinasa Axl del receptor a un grado similar.

Las Figuras 18A-18B muestran los experimentos de ELISA para comparar los efectos de anticuerpos anti-Axl quiméricos y de rata en fosforilación Axl. Las células de cáncer del cuello del útero CaSki son cosechadas, preincubadas con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo anti-Axl de rata 11B7 (figura 18A) o anticuerpo anti-Axl quimérico ch11B7 (figura 18B), tratados con o sin 400 ng/ml de mGas6, y se fijan con formaldehído. Las células son lavadas, detenidas e incubadas con anticuerpo primario MAP quinasa (Thr202/Tyr204) anti-fosfo-p44/p42, anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP y solución de tetrametilbencidina con el fin de medir las intensidades de absorbancia. Ver el texto para detalles. El anticuerpo anti-Axl de rata (figura 18A) y el anticuerpo anti-Axl quimérico ch11B7 (figura 18B) de la invención son capaces de bloquear la activación inducida por Gas6 de MAP-quinasa p42/p44 en células cancerígenas cervicales CaSki a grado similar como se indica por la disminución dependiente a concentración de la fosforilación de MAP-quinasa p42/p44 relativa.

La Figura 19 muestra la tinción TUNEL para investigar el efecto combinatorial de anticuerpos anti-AXL de rata y agentes quimioterapéuticos para vencer la resistencia a

fármaco en células de cáncer ováricas humanas. Las células cancerígenas ováricas NCI/ADR-RES humanas son pre-incubadas con 10 μg/ml de anticuerpo de control o el anticuerpo 11B7 anti-Axl antagonista y se co-incuban con doxorubicina en concentraciones finales de 100 μM, 150 μM, ó 200 μM. Aplicando un kit comercialmente disponible, la tinción de TUNEL se realiza con el fin de visualizar y determinar la apoptosis. Ver el texto para detalles. No hay tinción TUNEL, y por lo no apoptosis, se observa con células ováricas cancerígenas NCl/ADR-RES que son tratadas con 100 μM de doxorubicina, independientemente de si las células han sido co-incubadas con anticuerpo de control o el anticuerpo 11B7 anti-Axl antagonista (líneasuperior). Sin embargo, en una concentración de 150 μM de doxorubicina, solamente apoptosis de muchas semanas pueden ser detectadas en células co-tratadas con anticuerpo de control, mientras que la coincubación con el anticuerpo 11B7 anti-Axl antagonista resulta en una inducción substancial de apoptosis (líneamedia). También en la presencia de 200 μM de doxorubicina, la co-incubación de células con 11B7 incrementa significativamente las velocidades de apoptosis como se compara con células que son incubadas con el anticuerpo IgG de control (líneainferior), indicando que el co-tratamiento de incluso múltiples células tumorales resistentes a fármacos con ambos agentes quimioterapéuticos y anticuerpos anti-Axl antagonistas de la invención pueden ser adecuados para vencer la resistencia a fármacos.

Las Figuras 20A-20B muestran el ensayo de agar suave para investigar el efecto combinatorial de anticuerpos anti-AXL de rata y agentes quimioterapéuticos en crecimiento independiente a anclaje de células de melanoma humano. Las

células de melanoma C-B161 humano permanecen ya sea no tratadas o son incubadas con el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista de rata en una concentración final de 2.5 µg/ml. Combinado con la cisplatina en las concentraciones indicadas, se permite que las células embebidas en agar crezcan en la parte superior de una capa de agar de línea inferior 0.7% por 5 días. Se tiñen con MTT, el área de colonias es entonces medido. Ver el texto para detalles. Los números absolutos que reflejan el área total de colonias (figura 20A) y la inhibición de crecimiento relativa (figura 20B) calculado en la base de estos datos son mostrados. Como se compara con células de control no tratadas, la incubación con cisplatina lleva al retardo de crecimiento de colonias en una forma dependiente a dosis. En línea con el efecto inhibitorio de 11B7 solo en el intervalo de 30%, la combinación con el anticuerpo 11B7 anti-Axl antagonista resulta en un efecto inhibitorio potenciado significativamente de cisplatina en agar suave crecido de células de melanoma C-8161, particularmente en concentraciones menores de cisplatina.

Descripción detallada de la invención

Además, la presente invención debe ser explicada por los siguientes ejemplos y las figuras acompañantes.

Ejemplos

Comentarios Generales

Los siguientes ejemplos, los cuales incluyen los experimentos realizados y resultados logrados, son proporcionados para propósitos ilustrativos solamente y no son construidos como limitantes ante la presente invención.

Ejemplo 1. Generación de fibroblastos de Ratl de sobreexpresión de AXL como inmunogén y fibroblastos NIH3T3 de

sobreexpresión de AXL como sistema de modelo experimental

La secuencia de codificación de longitud completa para la variante 1 de transcripción de AXL de tirosina quinasa del receptor humano de acuerdo al National Center para Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés) secuencia de referencia (NM_021913) es subclonada en pLXSN por medio de elementos de reconocimiento de flanqueo para las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI, por lo mismo resultando en el vector de expresión retroviral pLXSN-hAXL.

Para la generación de anticuerpos que enlazan específicamente al receptor AXL de tirosina quinasa humano, los fibroblastos Ratl que sobre expresan establemente el AXL humano son generados por transferencia de gen retroviral. En resumen, se cultivan $3x10^5$ células Phoenix-E en cajas petri de cultivo de 60 mm y se transfectan con 2 µg/ml de vector pLXSN o pLXSN-hAXL usando el método de fosfato de calcio. Después de 24 horas, se reemplaza el medio por medio fresco en el cual se incuban las células Phoenix-E por 4 horas. Los sobrenadantes de las células Phoenix-E que liberan el virus ecotrófico pLXSN o pLXSN-hAXL se cosechan y usan para la incubación de células Ratl subconfluentes ($2x10^5$ células por caja petri de 6 cm) por 3 horas en la presencia de Polibreno (4 mg/ml; Aldrich). Simultáneamente, se re-incuban las células Phoenix-E con medio fresco, el cual después de otras 3 horas se usa para una segunda infección de los fibroblastos Ratl en la presencia de Polibreno (4 mg/ml; Aldrich). Similarmente, un tercer ciclo de infección se realiza. Después de cambiar el medio, se inicia la selección de células Ratl con G418. Usualmente, los clones estables son tomados después de una selección por 21 días.

Se propaga un panel de clones estables y se cuantifican para expresión de AXL humano localizado en membrana por análisis FACS. En detalle, $1x10^5$ células son cosechadas con 10 mM de EDTA en PBS, se lava una vez con amortiguador FACS (PBS, 3% de FCS, 0.4% de azida) y se siembra en una placa de línea inferior redondo de 96 pozos. Las células son giradas por 3 minutos en 1,000 rpm para remover el sobrenadante y se resuspenden con anticuerpo MAB154 primario anti-AXL de ratón (R&D Systems, 3 µg/ml). Las suspensiones celulares son incubadas en hielo por 1 hora, se lavan dos veces con amortiguador FACS y se vuelven a suspender en 100 µl/pozo de anticuerpo secundario anti ratón de burro conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en amortiguador FACS. Las suspensiones celulares son incubadas en hielo y en la oscuridad por 30 minutos, dos veces con amortiguador FACS y se analiza usando citómetro de flujo XL-MCL Epics (Beckman Coulter).

Las Figuras 1A-1B muestran el análisis FACS de la población Ratl-Mock policlonal infectada establemente con el vector vacío pLXSN y establemente infectado con Ratl-AXL cl.2 con pLXSN-hAXL y demuestra la sobreexpresión de AXL en la superficie celular de este clon representativo.

Adicionalmente, con el fin de generar un sistema modelo celular adecuado para propósitos experimentales, los fibroblastos de NIH3T3 que expresan establemente AXL son generados en analogía a procedimientos descritos para Ratl. En resumen $3x10^5$ células Phoenix-E son sembradas en cajas petri de cultivo de 60 mm y transfectadas con 2 µg/ml del vector pLXSN o ADNc de pLXSN-AXL usando el método de fosfato de calcio. Después de 24 horas, se reemplaza el medio por medio

fresco en el cual se incuban las células Phoenix-E por 4 horas. Los sobrenadantes de células Phoenix-E que liberan el virus ecotrófico pLXSN o pLXSN-hAXL son cosechados y usados para la incubación de células NIH3T3 subconfluentes ($2x10^5$ células por caja petri de 6 cm) por 3 horas en la presencia de Polibreno (4 mg/ml; Aldrich). Simultáneamente, las células Phoenix-E son re-incubadas con medio fresco, el cual después de otras 3 horas se usan para una segunda infección de los fibroblastos NIH3T3 en la presencia de Polibreno (4 mg/ml; Aldrich). Similarmente, un tercer ciclo de infección es realizado. Después de cambiar el medio, se inicia la selección de células NIH3T3 con G418. Usualmente, los clones estables son tomados después de la selección por 21 días.

Se propaga un panel de clones estables y se cuantifica para expresión de AXL localizada por membrana por análisis FACS. En detalle, $1x10^5$ células son cosechadas con 10 mM de EDTA en PBS, se lava una vez con amortiguador de FACS (PBS, 3% de FCS, 0.4% de azida) y se siembra en una placa de línea inferior redondo de 96 pozos. Las células son agitadas por 3 minutos en 1000 rpm para remover el sobrenadante y son resuspendidas con anticuerpo MAB154 primario anti-AXL de ratón (R&D Systems, 3 µg/ml). Las suspensiones celulares son incubadas en hielo por 1 hora, se lavan dos veces con amortiguador FACS y se vuelven a suspender en 100 µl/pozo de anticuerpo secundario antiratón de burro conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en amortiguador de FACS. Las suspensiones celulares son incubadas en hielo y en la oscuridad por 30 minutos, se lava dos veces con amortiguador FACS y se analiza usando un citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

Las Figuras 2A-2B muestran el análisis FACS de la polación NIH3T3-Mock policlonal infectada establemente con el vector vacío pLXSN e infectado establemente NIH3T3-AXL cl.7 con pLXSN-hAXL y demuestra la sobreexpresión AXL en la superficie celular de este clon representativo.

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

Los anticuerpos anti-AXL de rata monoclonales son incrementados por inyección de aproximadamente $10x10^6$ células congeladas de Ratl-AXL cl.2 tanto i.p y subcutáneamente en ratas Lou/C o Long Evans. Después de un intervalo de 8 semanas, se da un refuerzo final i.p. y subcutáneamente 3 días antes de la infusión. La fusión de la línea celular de mieloma P3X63-Ag8.653 con las células de bazo inmunólogicas de rata se realiza de acuerdo a procedimientos estándar y produce 105 hibridomas. Después de 2 semanas, se recolectan los primeros sobrenadantes de hibridomas y se pruebas en un tamiz de FACS primario para enlace a los fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 contra células de control NIH3T3-Mock. Los clones positivos para enlace a AXL son además cultivados. A partir de 50 ml de sobrenadante de estos clones, los anticuerpos son purificados y se reanalizan para enlace específico a AXL en fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 contra células de control NIH3T3 Mock. Los anticuerpos purificados los cuales enlazan específicamente a fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 pero no células de control NIH3T3-Mock son adicionalmente probados en ELISA de fosforilación Akt-quinasa y se realiza ELISA para determinar el isotipo. Para purificación de anticuerpos de rata, los sobrenadantes son agitados por 20 minutos en 5,000 g y se filtran subsecuentemente para esterilización, 500 µl de

proteína G sepharose FF se agrega y se incuban en 4°C por al menos 1 hora en una rueda de agitación. Se agita para separar la sepharose, se descarga el sobrenadante y se lava la matriz de proteína G dos veces con PBS antes a la elución de proteína utilizando un amortiguador de citrato (100 mM) pH 2.1. Las fracciones de elución son reamortiguadas inmediatamente a pH neutral por agregar Tris 1M pH 8.0 y se dializa contra PBS.

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

No.	Clon	Subclase	Cambio de FACS NIH3T3-pLXSN Control	Cambio de FACS NIH3T3-hAXLC18
1	I 1b11	2a	0,8	53,8
2	I 1C8	IgM/2a	0,9	55,0
3	I 2F3	2a	0,8	52,4
4	I 6E7	2a	1,8	62,3
5	I 7E6	2a	0,8	47,1
6	I 7G1	G1	0,7	32,0
7	I 7G11	G1	3,5	8,8

8	I 8E5	G1	1	33,0
9	I 9H3	G1	0,5	40,4
10	I 10A10	LgM/2a	0,5	32,6
11	I 10D9	2a	0,7	47,4
12	I 10D12	G1	0,5	37,5
13	I 11B7	LgM/1/2c	0,6	36,2
14	I 11D7	LgM/2a	0,7	9,6
15	I 12B7	2a/2c	0,8	43,6
16	II 2B8	LgM/G1	0,6	2,5
17	II 2D4	2a	0,8	46,5
18	II 6A5	G1	0,6	13,1
19	II 8A8	2a	0,6	34,6
20	III 1A10	2a	1,4	54,5
21	III 1B1	2a	7,5	24,6
22	III 1B3	LgM/2a	1,1	53,3
23	III 1B6	2b	1,1	15,3
24	III 1B11	2b	1,1	11,1
25	III 1C3	2b	1,0	24,2
26	III 1C10	-	1,1	22,1
27	III 1D2	LgM/2b	3,0	26,6
28	III 11D5	2a	1,5	8,9
29	III 1D7	2b	1,0	17,3
30	III 1D11	-	1,1	10,9
31	III 1D12	2b	1,0	7,7
32	III 1E7	-	1,1	81,4
33	III 1E11	G1/2a	1,2	44,0
34	III 1F2	G1	1,2	42,2
35	III 1F3	2b	1,1	9,0
36	III 1G2	-	1,0	30,5
37	III IG9	2a	1,3	89,2

38	III 1G11	-	1,1	54,7
39	III 1G12	-	1,1	59,4
40	III 1H4	LgM/2b	1,0	20,0
41	III 1H8	2a/2b	1,0	10,1
42	III 1H9	2b	0,9	13,6
43	III 2A1	2a	1,0	36,0
44	III 2A2	2b	1,0	10,5
45	III 2A4	2b	1,2	11,8
46	III 2B1	2b	0,9	16,0
47	III 2B6	2a/2b	1,0	39,7
48	III 2B8	2a	1,0	53,3
49	III 2B10	2b	1,1	10,6
50	III 2C12	2a/2b	1,0	11,2
51	III 2D1	2a/2b	1,0	42,0
52	III 2D3	2b	0,9	17,8
53	III 2D8	2a	1,4	109,7
54	III 2D12	2b	1,8	16,0
55	III 2E11	2b	1,0	14,8
56	III 2G4	-	1,0	8,5
57	III 2H7	-	1,0	91,2
58	III 3A1	2a	1,5	82,5
59	III 3A2	2b	1,0	7,4
60	III 3A3	LgM/G1	2,0	49,6
61	III 3B2	-	1,0	11,3
62	III 3B3	2b	0,8	12,4
63	III 3B4	LgM	1,2	98,0
64	III EB5	LgM/2b	1,6	74,0
65	III 3B7	2b	1,8	13,4
66	III 3B10	2a	1,1	70,6
67	III 3C3	-	1,3	45,7

68	III 3C4	-	1,4	15,2
69	III 3C10	2a	15,2	83,3
70	III 3C12	2b	1,2	41,8
71	III 3D2	2b	0,9	11,8
72	III 3D3	2a	1,0	54,4
73	III 3E1	-	1,2	49,7
74	III 3E3	2a/2b	1,3	16,0
75	III 3E5	2a	1,1	56,4
76	III 3F1	2b	1,0	9,8
77	III 3G1	2a	1,2	57,8
78	III 3G3	2a	1,1	45,7
79	III 3G6	2a	1,1	55,9
80	III 3H4	2b	1,0	43,3
81	III 3H5	2b	1,0	11,8
82	III 4A4	LgM	1,3	8,5
83	III 4A5	2a	1,9	32,8
84	III 4A6	2a	2,5	10,4
85	III AB1	2b	1,9	10,2
86	III 4B5	2b	1,6	6,4
87	III AB6	2a	1,9	56,8
88	III AB9	LgM/2b/2c	1,7	16,6
89	III AB11	2a	1,2	58,1
90	III AC2	-	1,6	7,4
91	III 4C8	2a	12,8	21,3
92	III AD1	-	1,6	7,9
93	III AD9	-	1,1	31,2
94	III AD10	2a	3,8	7,5
95	III AE11	2b	1,5	7,6
96	III AF6	-	1,2	5,5
97	III AF8	2a	1,2	51,3

98	III AF11	LgM	1,2	12,9
99	III 4F12	2a	1,1	52,6
100	III AG2	2a	1,0	52,4
101	III AG11	LgM/2b	1,1	8,9
102	III 4H4	2b	3,1	61,3
103	III 4H5	2a	2,7	20,0
104	III 4H10	LgM/2a	1,3	49,2
105	III 4H11	LgM	3,3	124,0

Ejemplo 3: Anticuerpos anti-AXL de rata de la invención no reaccionan cruzado con AXL de ratón u otros miembros de la familia AXL humana, Mer y Sky

Este ejemplo maneja la reactividad cruzada de anticuerpos anti-AXL de rata de la invención con AXL de mono cynomolgus y de ratón así como también con los otros miembros de la familia AXL humano, Mer humano y Sky humano. Después de subclonar la secuencia de codificación de AXL de ratón y de mono así como también Mer y SKy humano en pcDNA3, cada construcción de expresión es transfectada en fibroblastos HEK293T. La capacidad de anticuerpos anti-AXL de rata de la invención para enlazar estas proteínas es probado por el análisis FACS.

3 A. Clonación de AXL de ratón

En el presente estudio, se genera la construcción pcDNA3-mAXL de expresión de AXL de ratón. La secuencia de codificación de longitud completa de AXL de ratón es amplificada por la reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) usando el ADNc de corazón de ratón (Ambion) como templado y los cebadores apropiados de acuerdo a la secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés)

(NM_009465) de AXL de ratón. La codificación de secuencia de longitud completa para AXL de ratón es por lo mismo cubierta por dos fragmentos de PCR de traslape, un fragmento 5´ y un fragmento 3´. Los cebadores para amplificación de estos fragmentos son como a continuación:

MOUSE1 de cebador cadena adelante para el fragmento 5´ que porta una secuencia de reconocimiento de EcoRI:

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

MOUSE2 de cebador inverso para el fragmento 5´:

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

MOUSE3 de cebador cadena adelante para el fragmento 3´:

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

MOUSE4 de cebador inverso para el fragmento 3´ que porta una secuencia de reconocimiento Notl

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

Se digiere el fragmento 5´ con EcoRI y BstEII, el fragmento 3´ es digerido con BstEII y Notl, y se escinde el pcDNA3 con EcoRi y Notl. Una ligación de factor 3 de los fragmentos aislados y purificados es realizado y transformado en células bacterianas DH5α. Se toma una colonia sencilla y se hace crecer en la presencia de ampicilina. Usando un kit de purificación de plásmido comercialmente disponible (Qiagen), el vector de expresión de AXL de ratón pcDNA3-mAXL es purificado, y la secuencia es verificada para transfección temporal subsecuente en las células HEK293T.

3. Clonación de AXL de mono cynomolgus

En el presente estudio, las construcciones de

expresión AXL de mono cynomolgus pcDNA3-cyAXL son generadas. La secuencia de codificación de longitud completa de AXL de mono cynomolgus es amplificada pore PCR usando ADNc preparado de tejido de cerebro de mono cynomolgus como templado. Ya que la secuencia de nucleótido de AXL de mono cynomolgus no está disponible, los cebadores respectivos son diseñados asumiendo homología significativa a AXL humano. La secuencia de longitud completa la cual codifica para AXL de mono cynomolgus es por lo mismo cubierta por dos fragmentos de PCR de traslape, un fragmento 5´ y un fragmento 3´. Los cebadores para amplificación de estos fragmentos son como a continuación:

Cebador cadena adelante CYNO1 para el fragmento 5´ que porta una secuencia de reconocimiento EcoRI

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

CYNO2 de cebador inverso para el fragmento 5´

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

CYNO3 de cebador cadena adelante para el fragmento 3´

5´-GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC-3´

CYN4 cebador inversio para el fragmento 3´ que porta una secuencia de reconocimiento NotI

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

Se digiere el fragmento 5´ con EcoRi y DraIII, el fragmento 3´ es digerido con DraIII y NotI, y se escinde el pcDNA3 con EcoRI y NotI. Una ligación de factor tres de los fragmentos aislados y purificados es realizada y transformada en células bacterianas DH5α. Se toma una colonia sencilla y se hace crecer en la presencia de ampicilina. Usando un kit de purificación de plásmido comercialmente disponible (Qiagen), el vector de expresión de AXL de mono cynomolgus pcDNA3-cyAXL es purificado, y la secuencia verificada para transfección temporal subsecuente en las

células HEK293T. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de mono cynomolgus son como a continuación:

ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTG
CTTGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCCAGGGGCACACAGG
CTGAAGAAAGTCCTTTCGTGGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCC
GGGGACTCACGGGCACCCTTCGGTGTCAGCTCCAGGTTCAGGGAGAG
CCCCCCGAGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGC
GGACAGTACCCAGACCCAGGTGCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGA
CTGGATAGTGGTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCCGAC
GCGGGACAGTACCAGTGTTTGGTGTTTCTGGGACATCAGAACTTCGTGT
CCCAGCCTGGCTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGG
AGCCTGAGGACAGGACTGTGGCCGCCAACACCCCCTTCAACCTGAGCT
GCCAAGCCCAGGGACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAG
GATGCTGTCCCCCTGGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAAC
CTGCATGTTCCAGGGCTGAACAAGACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCC
ATAACGCCAAGGGAGTCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGC
TCCCCCAGCAGCCCCGTAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGG
AGCTGGAGGTGGCTTGGACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCCTGA
CCCACTGCACCCTGCAGGCTGTGCTGTCAGACGATGGGATGGGCATCC
AGGCGGGAGAACCAGACCCCCCAGAGGAGCCCCTCACCTTGCAAGCAT
CTGTGCCCCCCCCACCAGCTTCGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCC
CTTATCACATCCGTGTGGCATGCACCAGCAGCCAGGGCCCCTCATCCT
GGACACACTGGCTTCCTGTGGAGACGCCGGAGGGAGTGCCCCTGGGC
CCCCCTGAGAACATTAGTGCCAGGCGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTG
C CTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAAGGAGAAGCTGC
C GGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGGAAGACTCTG
C GGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCAACCAGGA
A CGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGCCATCTGC
T ACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCCTGAGTGAAGCAGTCTGCATGAAG
G GAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTTTCCAGG
G GTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTCATCTTACCTTTCAT
T GAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTTGGGGA
T CCAGCCAGTGTACCTGCCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGGCGGA
C CATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTCATACACCGG
T GACCTGGCGGCCAGGAACTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTGTGT
GTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACTAC
CGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGAG
AGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCTTC
GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCA
GGCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGC
CTGAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTCG
CGGTGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTTACAGAGCTG
CGGGAAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCTCCTGCCCAGGAG
CCTGACGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTG
AACCTCCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCCAACCCAGCTAGACC
CTAAGGATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGG
ACGCTATGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGC

Secuencia de aminoácidos

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGAR
GLTGTLRCQLQVQGEPPEVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV
VSQLRIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRT
VAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNK
TSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLS
GIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHP
HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFV
HWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGSVSN

LTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPW
WYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRK
SYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG
QLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF
QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLHSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADI
ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYYRQG
RIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEI
YDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLK
ALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQLDPKDSCSCLTSA
EVHPAGRYVLCPSTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

3C. Clonación de Mer humano

En el estudio presente, se genera la construcción de

expresión Mer humano pcDNA3-hMer. La secuencia de codificación de longitud completa de Mer humano es obtenida a través de la escisión del vector pCMV6-XL4-human Mer (Origene #TC116132) con EcoRI y XbaI. Después de la digestión de pcDNA3 con las mismas endonucleasas de restricción, ambos fragmentos son ligados para generar pcDNa3-hMer. Con el fin de introducir una secuencia de consenso Kozak, la región 5´ de la secuencia de codificación Mer humano en pcDNA3-hMer es amplificada por PCR usando cebadores apropiados de acuerdo a la secuencia de referencia NCBI (NM_006343) de Mer humano. Los cebadores para amplificación de este fragmento son como a continuación:

MER1 de cebador cadena adelante que porta una secuencia de reconocimiento EcoRI y la secuencia de consenso Kozak:

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

MER2 de cebador inverso para el fragmento 5´:

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

El producto de PCR y el pcDNA3-hMer se digieren con EcoRI y EcoRV y se ligan para generar pcDNA3-Kozak-hMer, en el cual la secuencia de codificación Mer humano de longitud completa es precedida por una secuencia de consenso Kozak. Transformado en células bacterianas DH5α, se toma una sola colonia y se hace crecer en la presencia de ampicilina. Usando un kit de purificación de plásmido comercialmente disponible (Qiagen), el vector de expresión pcDNA3-Kozak-hMer es purificado, y la secuencia es verificada para transfección temporal subsecuente en células HEK293T.

3D. Clonación de Sky humano

En el presente estudio, se genera la construcción pcDNA3-hSky de expresión de Sky humano. La secuencia de

codificación de longitud completa de Sky humano es PCR amplificado usando el vector Sky pCMV6-XL4-human (Origene #MG1044_A02) como templado y los cebadores apropiados de acuerdo a la secuencia de referencia NCBI (NM_006293) de Sky humano. Los cebadores para amplificación son como a continuación:

SKY1 cebador cadena adelante que porta una secuencia de reconocimiento de EcoRI:

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

SKY2 de cebador inverso que porta una secuencia de reconocimiento XhoI:

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

El producto de PCR y el pcDNA3 son digeridos con EcoRI y XhoI y ligados para generar el vector de expresión pcDNA3-hSky. Transformado en células bacterianas DH5α, se toma una colonia sencilla y se hace crecer en la presencia de ampicilina. Usando un kit de purificación de plásmido comercialmente disponible (Qiagen), el vector de expresión pcDNA3-hSky es purificado, y se verifica la secuencia para transfección temporal subsecuente en las células HEK293T.

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

Para expresión temporal de AXL de ratón, AXL de mono cynomolgus, Mer humano o Sky humano, se transfectan temporalmente las células HEK293T con ya sea el vector vacío pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNa3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNa3-hMer o pcDNA3-hSky que aplica el método de fosfato de calcio. En resumen, antes a la transfección, $3x10^6$ células HEK293T en 16 ml de medio son sembradas en una caja de petri de cultivo de tejido celular de 15 cm y se hace crecer en 7% de CO y 37°C

por 30 horas, 32 µg de ADN de la construcción de expresión respectiva o vector vacío en 720 µl de ddH_2O se mezclan con 2.5 M de $CaCl_2$ y 2xBBS (pH 6.96) y se mantiene en temperatura ambiente por 10 minutos. Las soluciones son agregadas suavemente a cultivos celulares y se incuban en 3% de CO_2 y 37°C por 8 horas. Se reemplaza entonces el medio con medio de crecimiento fresco y se cultivan las células en 7% de CO_2 y 37°C por 24 horas.

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

Para análisis FACS, se cosechan $2x10^5$ células con EDTA 10 mM en PBS, se lava una vez con amortiguador de FACS (PBS, 3% de FCS, 0.4% de azida) y se siembran en una placa de línea inferior redondo de 96 pozos. Para remover el sobrenadante, las placas son agitadas por 3 minutos en 1000 rpm y se vuelven a suspender las células en 10 µg/ml de anticuerpo de control isotípico 1D5 así como también soluciones de anticuerpo primarios anti-AXL 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 y 12B7 (100 µl/pozo). Después de la incubación en hielo por 1 hora, se lavan las células dos veces con amortiguador de FACS frío y se vuelven a suspender con anticuerpo secundario anti-rata de burro conjugado a PE (Jackson) diluido 1:50 en amortiguador FACS (100 µl/pozo) o anticuerpo secundario anti ratón de burro conjugado a PE para control. Protegido de la luz, se incuban las células en hielo por 30 minutos, se lavan dos veces con amortiguador FACS y se analiza usando citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

La Figura 3 muestra resultados representativos de este experimento. Con excepción de 12B7 el cual muestra

reactividad cruzada moderada con AXL de ratón así como también Mer y SKy humano, ninguno de los anticuerpos anti-AXL de la invención reaccionan de forma cruzada con estas moléculas. En contraste, todos los anticuerpo anti-AXL de rata probados de la invención reaccionan cruzado con AXL de mono cynomolgus.

Ejemplo 4. Anticuerpos anti-AXL de rata de la invención inhiben la fosforilación AXL inducida por ligando *in vitro*

Se realizan los experimentos ELISA con el fin de investigar si los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención son capaces de bloquear la activación mediada por ligando Gas6 de AXL. La activación de AXL mediada por Gas6 es detectada por fosforilación de tirosina del receptor incrementada. En resumen, en el día 1, $3x10^4$ células por pozo se siembran en medio de crecimiento normal en placas de 96 pozos de línea inferior plano. Al día siguiente, se reemplaza el medio de crecimiento por medio libre de suero para cosechar las células durante la noche por 24 horas. También durante la noche, las placas de 96 pozos Maxi-Sorp negras (Nunc) son recubiertas con anticuerpo anti-fosfo-tirosina de ratón 4G10 en 2 µg/ml de PBS en 4°C. En el día 3, la solución de anticuerpo 4G10 es removida y se bloquean los pozos Maxi-Sorp con PBS, BSA al 0.5% por al menos 4 horas en temperatura ambiente. En paralelo, las células son preincubadas, con 10 µg/ml del anticuerpo 72A1 de control de ratón así como también los anticuerpos 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7 y 10D12 anti-AXL de rata por 1 hora en 37°C y entonces se trata con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) por 10 minutos en 37°C. Se remueve entonces el medio y las células son lisadas en amortiguador de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.5, 150 mM de NaCl, EDTA 1 mM, 10% de glicerina, y 1% de Triton X-100) complementado con fosfatasa e

inhibidores de proteasa (10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 MM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1mM de ortovanadato, 1mM de NaF, y 0.5% de aprotinina) por 30 minutos en hielo. Mientras tanto, se remueve el amortiguador de bloqueo y se lavan las placas Maxi-Sorp 6x con amortiguador de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20) antes los lisados son transferidos e incubados durante la noche en 4°C. Después se lavan las placas 6x con amortiguador de lavado en el día 4, los pozos son incubados con anticuerpo 12B7 anti-AXL de rata bioestañados en 0.5 µg/ml de PBS por 2 horas en temperatura ambiente. Las placas son lavadas 6x con amortiguador de lavado y estreptavidina conjugada a AP (Chemicon #Sa110) diluido 1:4,000 en PBS se agregan a cada pozo y se incuban por 30 minutos en temperatura ambiente. Después de esto, se lavan los pozos 6x con amortiguador de lavado y se agrega solución de substrato AttoPhos (Roche #11681982). Usando un lector de placa Victor (Perkin Elmer), la fluorescencia de cada pozo es recolectada en una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

Las Figuras 4A-4B muestran resultados representativos de este experimento para fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (figura 4A) y células cancerígenas de pulmón NCl-H292 (figura 4B). Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7, 11D5, 6E7, y 10D12 de la invención son capaces de bloquear o reducir la activación de AXL mediada por ligando como se indica por fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata de la invención estimulan la activación de AXL basal como se indica por fosforilación incrementada, no reducen significativamente la

activación de AXL mediada por ligando, y son por lo tanto considerados anticuerpos anti-AXL agonistas. Efectos similares con el mismo panel de anticuerpos son observados en las líneas celulares de cáncer pulmonar CaLu-1 y CaLu-6, las líneas celulares cancerígenas de mama Hs578T y MDA-MB-231, la línea celular de cáncer de próstata Pc-3, la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1, la línea celular de melanoma C-8161, las líneas celulares de cáncer ovárico SkOV-3 y SkOV-8, la línea celular de glioblastoma SF-126, la línea celular de cáncer del cuello del útero CaSki, así como también las líneas celulares de cáncer gástrico Hs746T y MKN-1.

Ejemplo 5. Anticuerpos anti-AXL de rata de la invención inhiben la fosforilación MAP-quinasa p42/p44 inducida por ligando *in vitro*

Después, los experimentos ELISA son realizados con el fin de investigar si los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención son capaces de bloquear la activación mediada por el ligando Gas6 de MAP-quinasa p42/p44. La activación de MAP-quinasa p42/p44 mediada por Gas6 es detectada por fosforilación de proteína incrementada (Thr202/Tyr204). En resumen, en el primer día, $2x10^4$ celulas por pozo son sembradas en placas de 96 pozos de línea inferior plano. Al día siguiente, se reemplaza el medio de crecimiento normal por medio libre de suero para cosechar las células por 36 horas. Después de esto, las células son preincubadas con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotípico 1D5 así como también los anticuerpos anti-AXL de rata 11D5, 11B7 y 2A1 por 1 hora en 37°C y entonces se tratan con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) por 10 minutos en 37°C. El medio es removido y se fijan las células con 4% de formaldehído en PBS (pH 7.5) por

30 minutos en temperatura ambiente. La solución de formaldehído es removida y se lavan las células dos veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.1% de Tween 20). Las células se detienen con 1% de H_2O_2, 0.1% de NaN_3 en amortiguador de lavado e incubadas por 20 minutos en temperatura ambiente. Después de eso, se remueve la solución de detención, y se lavan las células dos veces con amortiguador y se bloquean con PBS, BSA al 0.5% por 4 horas en 4°C. El anticuerpo primario de MAP-quinasa anti-fosfo-p42/p44 (Thr202/Tyr204) (conejo policlonal: señalización de célula #9101) diluido 1:500 en PBS, BSA al 0.5%, EDTA 5 mM es agregado durante la noche en 4°C. En el día 4, se remueve la solución de anticuerpo durante la noche en 4°C. En el día 4, se remueve la solución de anticuerpo y se lava la placa 3x con amortiguador de lavado. El anticuerpo secundario anticonejo conjugado a HRP (Dianova #111-036-045) diluido 1:2,500 en PBS, 0.5% de BSA es entonces agregado a cada pozo y se incuba por 1.5 horas en temperatura ambiente. Se lava la placa 3x con amortiguador de lavado y dos veces con PBS por 5 minutos cada uno. Se agrega tetrametilbencidina (TMB-Calbiochem) y se monitorea en 620 nm. Se detiene la reacción por adición de 100 µl de 250 nM de HCl y se lee la absorbancia en 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placa Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 5 muestra resultados representativos de este experimento para la línea celular de cáncer del cuello del útero CaSki. Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 de la invención son capaces de reducir la activación de MAP-quinasa p42/p44 mediada a ligando como se indica por fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo

anti-AXL 2A1 de la invención estimula la activación de MAP-quinasa p42/p44 basal como se indica por fosforilación incrementada, no reduce la activación de MAP quinasa p42/p44 mediada a ligando, y es por lo tanto considerada un anticuerpo anti-AXL agonista. Efectos similares con el mismo panel de anticuerpos son observados en la línea celular de cáncer de mama Hs578T y la línea celular de cáncer de pulmón NCl-H292.

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

Adicionalmente, se realizan los experimentos de ELISA con el fin de investigar si los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención son capaces de bloquear la activación mediada por ligando Gas6 de Akt-quinasa. La activación de Akt-quinasa mediada por Gas6 es detectada por fosforilación incrementada de proteína (Ser473). En resumen, en el día 1 se siembran $2x10^4$ células por pozo en placas de 96 pozos de línea inferior plano. Al día siguiente, se reemplaza el medio de crecimiento normal por medio reducido en suero (DMEM, 0.5% de FCS para fibroblastos NIH3T3-AXL) o libre de suero (para líneas de células de cáncer) para cosechar las células por 36 horas. Después de esto, las células son preincubadas con 10 µg/ml del anticuerpo de control isotípico 1D5 así como también los anticuerpos anti-AXL de rata 11D5, 11B7, y 2A1 por 1 hora en 37°C y entonces se tratan con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) por 10 minutos en 37°C.

El medio es removido y se fijan las células con 4% de formaldehído en PBS (pH 7.5) por 30 minutos en temperatura ambiente. Se remueve la solución de formaldehído y se lavan las células dos veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.1% de Tween 20). Las células son detenidas con 1% de H_2O_2. 0.1% de

NaN_3 en amortiguador de lavado y se incuban por 20 minutos en temperatura ambiente. Después de eso, se remueve la solución de detención, y se lavan las células dos veces con amortiguador de lavado y se bloquean con PBS, 0.5% de BSA por 4 horas en 4°C. El anticuerpo primario anti-fosfo-Akt (Ser473) (conejo policlonal: Señalización de célula #9271) diluido 1:500 en PBS, 0.5% de BSA, EDTA 5 mM es agregado durante la noche en 4°C. En el día 4, se remueve la solución de anticuerpo y se lava la placa 3x con amortiguador de lavado. Se agrega entonces el anticuerpo secundario anticonejo conjugado a HRP (Dianova #111-036-045) diluido 1:2,500 en PBS, 0.5% de BSA a cada pozo y se incuba por 1.5 horas en temperatura ambiente. Se lava la placa 2x con amortiguador de lavado y dos veces con PBS por 5 minutos cada uno. Se agrega la tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se monitorea en 620 nm. Se detiene la reacción por adición de 100 µl de HCl 250 nM y se lee la absorbancia en 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placa Vmax (Termo Lab Systems).

Las Figuras 6A-6B muestran resultados representativos de este experimento para fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 (figura 6A) y células de cáncer de pulmón CaLa-1 (figura 6B). Los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 de la invención son capaces de bloquear o reducir la activación de Akt-quinasa mediada por ligando como se indica por fosforilación disminuida, y son de esta forma considerados anticuerpos anti-AXL antagonistas. En contraste, el anticuerpo 2A1 anti-AXL de la invención estimula la activación Akt-quinasa basal como se indica por fosforilación incrementada, no reduce la activación Akt-quinasa mediada por ligando y es

por lo tanto considerado un anticuerpo anti-AXL agonista. Efectos similares con el mismo panel de anticuerpos son observados en la línea celular de cáncer de pulmón NCl-H292, las líneas celulares de cáncer de mama Hs578T y MD-MB-231, la línea celular de cáncer de próstata PC-3, la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1, la línea celular de melanoma C-8161, las líneas celulares de cáncer de ovario SkOV-3 y SkOV-8, la línea celular de cáncer de vejiga TCC-Sup, así como también la línea celular de fibrosarcoma HT1080.

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

Los derivados quiméricos de los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 son generados como parte de esta invención (ver posteriormente). Con el fin de investigar si los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención y los anticuerpos anti-AXL quiméricos correspondientes de la invención son capaces de bloquear la activación mediada por ligando Gas6 de la Akt-quinasa en fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 a grado similar. Los experimentos ELISA son realizados. La inhibición de Akt-quinasa mediada por anticuerpo es detectada por fosforilación de proteína disminuida (Ser473). En resumen, en el día 1.2 $x10^4$ células por pozo son sembradas en placas de 96 pozos de línea inferior plano. El día siguiente, se reemplaza el medio de crecimiento normal por medio reducido en suero (DME, 0.5% de FCS) para cosechar las células por 36 horas. Después de esto, se pre-incuban las células con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml y 1 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo 11D5 anti-AXL de rata o anticuerpo ch11D5 anti-AXL quimérico por 1 hora en 37°C y

entonces se trata con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) por 10 minutos en 37°C. Se remueve el medio y se fijan las células con 4% de formaldehído en PBS (pH 7.5) por 30 minutos en temperatura ambiente. Se remueve la solución de formaldehído y se lavan las células dos veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.1% de Tween 20). Se detienen las células con 1% de H_2O_2, 0.1% de NaN_3 en amortiguador de lavado y se incuban por 20 minutos en temperatura ambiente. Después de esto, se remueve la solución de detención, y se lavan las células dos veces con amortiguador de lavado y se bloquean con PBS, 0.5% de BSA por 4 horas en 4°C. El anticuerpo primario anti-fosfo-Akt (Ser473) (conejo policlonal: Señalización celular #9271) diluido 1:500 en PBS, 0.5% de BSA, 5 mM de EDTA es agregado durante la noche en 4°C. En el día 4, se remueve la solución de anticuerpo y se lava la placa 3x con amortiguador de lavado. Se agrega entonces el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (Dianova #111-036-045) diluido 1:2,500 en PBS, 0.5% de BSA a cada pozo y se incuba por 1.5 horas en temperatura ambiente. Se lava la placa 3x con amortiguador de lavado y dos veces con PBS por 5 minutos cada uno. Se agrega la tetrametilbencidina (TMb, Calbiochem) y se monitora en 620 nm. Se detiene la reacción por adición de 100 µl de 250 nM HCl y se lee la absorbancia en 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placa Vmax (Thermo Lab Systems).

La Figura 7 demuestra que el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata y anticuerpo ch11B7 anti-AXL quimérico de la invención así como también el anticuerpo 11D5 anti-AXL de rata y el anticuerpo ch11D5 anti-AXL quimérico de la invención son capaces de inhibir la activación de Akt-quinasa mediada por

ligando a grado similar como se indica por la fosforilación disminuida. De esta forma, como se compara con sus contrapartes de rata respectivas, los anticuerpos ch11B7 y ch11D5 anti-AXL quiméricos mantienen la actividad.

Ejemplo 8. anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas de la invención compiten entre sí para los mismos epítopos o epítopos estructuralmente relacionados y no comparten sitios de enlace con anticuerpos anti-AXL de rata agonistas de la invención.

Los anticuerpos anti-AXL de la invención son examinados para ver si compiten entre sí para epítopos de enlace similares en el dominio de AXL-ECD. Por lo tanto, el enlace de anticuerpos anti-AXL bioestañados para placas recubiertas con dominio AXL-ECD preincubadas con anticuerpos anti-AXL es determinado en un ELISA de competición. En resumen, 30 µg de anticuerpo de control isotípico 1D5 así como también anticuerpos anti-AXL de rata 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7 y 2A1 son bioestañados con Sulfo-NHS-Biotina (Pierce #21217) de acuerdo a las instrucciones de fabricante y purificados utilizando las columnas Micro-Spin P6 SSC (BIO-RAD #732-6200). En el día 1, las placas Maxi-Sorp de 96 pozos negras (Nunc) son recubiertas con 100 µl/pozo de 1 µg/ml de AXL-ECD humano (R&D Systems #154-AL) en PBS durante la noche en 4°C. En el día 2, las placas Maxi-Sorp recubiertas son bloqueadas con amortiguador de bloqueo (PBS, 1% de BSA, 0.05% de Tween-20) por 2 horas en temperatura ambiente (250 µl/pozo), y se incuban subsecuentemente con PBS o anticuerpo de control isotipico no bioestañado 1D5 así como también anticuerpos anti-AXL de rata no bioestañados 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, ó 2A1 en 10 µg/ml en amortiguador de bloqueo (100

µl/pozo) por 1 hora en temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpo son removidas sin lavado y 100 µl/pozo PBS ó anticuerpo de control isotítpico bioestañado 1D5 así como también anticuerpos anti-AXL de rata bioestañados 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, ó 2A1 en 0.5 µg/ml en amortiguador de bloqueo son agregados y se incuba por 15 minutos en temperatura ambiente. Después de lavado 6x con amortiguador de lavado (PBS, 0.1% de Tween-20), 80 µl/pozo de estreptavidina conjugado a AP (Chemicon #SA110) diluido 1:4,000 en amortiguador de bloqueo son agregados, incubados por 20 minutos en temperatura ambiente se lavan otra vez 6x con amortiguador de lavado y finalmente se lava una vez con PBS. Para detección, se agregan 100 µl/pozo de solución de substrato Attophos (Roche #11681982). Usando un lector de placa Victor (Perkin Elmer), la fluorescencia de cada pozo es recolectada en una longitud de onda de excitación de 430 nm una longitud de onda de emisión de 580 nm.

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

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

Para examinar la migración y las proporciones de

proliferación de diferentes células y condiciones de cultivo, los ensayos de curación de herida/rasguño *in vitro* se han usado por muchos años. Estos ensayos generalmente implican hacer crecer una primera monocapa de células confluente. Un área pequeña es entonces alterada y un grupo de células son destruidas o desplazadas por rasguñar una línea a través de la capa con, por ejemplo, una punta de pipeta. El espacio abierto es entonces inspeccionado microscópicamente al paso del tiempo en cuanto las células mueven y llenan el área dañada ("curación"). En resumen, 1.5 x 10^6 NCl-H292 células de cáncer pulmonar son sembradas por pozo de una caja petri de 12 pozos y se cultiva en medio de crecimiento normal (RPMI, 10% de FCS). Después de 8 horas, las células son enjuagadas con PBS y se cosechan en medio bajo en suero (RPMI, 0.5% de FCS) durante la noche por 24 horas. Usando una punta de pipeta de 200 µl estéril, tres heridas uniformes separadas por pozo son hechas a través de las monocapas de células NCl-H292 confluentes. Las células son enjuagadas suavemente con PBS y se incuban con medio bajo en suero (RPMI, 0.5% de FCS) el cual no contiene aditivo, 10 µg/ml del anticuerpo de control isotipico 1D5, los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11D5, 11B7, 6E7 ó 10D12, los anticuerpos anti-AXL quiméricos chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2, los anticuerpos anti-AXL de rata agonistas 2A1 y 11D7 así como también 10 µg/ml de Erbitux ó 5 µM de Sutent para comparación. Las células son permitidas migrar en el área de clarificación por 24 horas, se lava una vez con PBS y se fija con metanol enfriado en hielo (100%) en -20°C. Después de que se tiñen las células con cristal violeta (0.5% en 20% de metanol), se enjuagan con agua y se secan durante la noche, se toman fotos de heridas.

La Figura 9 muestra resultados representativos de este experimento para células de cáncer de pulmón NCl-H292. Comparado con el anticuerpo de control isotipico, los anticuerpos anti-AXL de rata 11D5, 11B7, 6E7 y 10 D12 de la invención, así como también los anticuerpos anti-AXL quiméricos chn11D5 IgG2 y chn11B7 IgG2 de la invención reducen la repoblación del área de espacio, mientras que los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata agonistas de la invención llevan a cierre completo de la herida. Los resultados similares con el mismo panel de anticuerpos son observados con la línea celular de cáncer ovárica SkOv-3 o la línea celular de cáncer gástrico MKN-1.

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

Se realizan los experimentos de transmigración con el fin de investigar si los anticuerpos de la invención bloquean la migración celular. Para este propósito, en la mañana del día 1, las células NIH3T3-AXL cl.7 se siembran en cajas petri de 15 cm en medio de crecimiento normal, el cual en la tarde se reemplaza por medio reducido en suero (DMEM, 0.5% de FCS) con el fin de cosechar las células por 36 horas. Al siguiente día, una placa de 96 pozos FluoroBlock (Becton Dickinson #351164, tamaño de poro 8 µm) se recubre con 10 µg de colágeno 1/ml ácido acético 0.1 M durante la noche en 37°C. En el día 3, el medio reducido en suero (DMEM, 0.5% de FCS) es reemplazado por medio libre de suero (DMEM, 0% de FCS, 0.1% de BSA) por otras 4 horas. Las células son cosechadas con 10 mM de EDTA en PBS y se preincuban con anticuerpos anti-AXL de rata 4A6, 11B7 ó 2A1 en una densidad celular de $4x10^5$

células/ml y una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml por 45 minutos, 50 µl de suspensión celular (20,000 células) por pozo son entonces colocados en la cámara superior de la placa de 96 pozos FluoroBlock, 225 µl de medio (DMEM, 0% de FCS, 0.1% de BSA) con o sin 400 ng/ml de Gas6 de ratón (R&D Systems) son usados por pozo en la cámara de línea inferior. Las células son dejadas migrar por 7 horas en 37°C y se tiñen después de esto con 4.2 µM calceina-AM (sondas moleculares #C3099) en PBS, 1 mM $CaCl_2$, $MgCl_2$ 1 mM por 1 hora en 37°C. Usando un lector de placa Victor (Perkin Elmer), se mide la fluorescencia de cada pozo en una longitud de onda de 530 nm.

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

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

Los experimentos *in vitro* son realizados con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención para inhibir la proliferación de células inducida por Gas6. Para este propósito, 2,500 fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 por pozo son sembrados en medio el cual contiene FCS en placas de 96 pozos durante la noche. Al siguiente día, se cosechan las células en medio reducido en suero (DMEM, 0.5% FCS) por 10 horas y subsecuentemente se preincuban con 20 µg/ml del anticuerpo de control de ratón

72A1, los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11D5 y 11B7, así como también el anticuerpo agonista 2A1 en DMEM, 0.5% de FCS por 1 hora en 37°C. Las células son tratadas con o sin 400 ng/ml de Gas6 de ratón (R&D Systems) por agregar el ligando directamente a la solución de anticuerpo, y son dejados crecer por 96 horas. Se agrega AlarmarBlue™ (BIOSOURCE #DAL 1100) y se incuba en 37°C en la oscuridad. Se mide la absorbancia en 590 nm cada 30 minutos. Los datos son tomados 4 horas después de la adición de AlamarBlue™.

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

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

Inducción de apoptosis y activación de caspasas puede resultar a partir de una variedad de estímulos incluyendo extracción de factor de crecimiento, exposición a agentes quimioterapéuticos o radiación, o inicio del proceso de muerte celular mediada por receptor Fas/Apo-1. La interacción Gas6-AXL ha sido mostrada para estar implicada en la protección de un intervalo de tipos celulares de apoptosis, incluyendo fibroblastos NIH3T3 cosechados por suero (Goruppi et al., 1996, Oncogene 12, 471-480) o células endoteliales pulmonares (Healy et al., 2001, Am. J. Physiol., 280, 1273-1281). En el ejemplo presente se examina si los anticuerpos

anti-AXL de rata de la invención interfieren con anti-apoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 cosechado en suero y de esta forma induce la apoptosis. Las velocidades de apoptosis son por lo mismo determinadas por medición de la actividad de caspasa-3/7 celular. Para este propósito, las células NIH3T3-AXL cl7 son sembradas en una densidad de $1.5x10^3$ células por pozo en placas de 96 pozos de línea inferior claro negras (100 µl/pozo). El día después, se reemplaza el medio de crecimiento normal por medio reducido en suero (DMEM, 0.5% de FCS) para cosechar las células durante la noche por 24 horas. Al siguiente día, se preparan las soluciones de anticuerpos del anticuerpo de control isotipico 1D5, los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11B7 y 11D5, así como también los anticuerpos anti-AXL de rata agonistas 11D7 y 2A1 en 80 µg/ml en DMEM, 0% de FCS, 0.01% de BSA. Se lavan las células con PBS, se cubren con 60 µl de DMEM, 0% de FCS, 0.01% de BSA, y 10 µl de la solución de anticuerpo respectiva se agregan. Después de 1 hora de incubación en 37°C, 10 µl de DMEM, 0% de FCS, 0.01% de BSA con o sin se agregan 3.2 µg/ml de Gas6 de ratón (R & D Systems)(las concentraciones finales de anticuerpo y Gas6 son 10 µg/ml y 400 ng/ml, respectivamente) y se incuban las células en 37°C por otras 5 horas. Las siguientes etapas se refieren al boletín técnico para el ensayo Apo-ONE Homogenwous Caspase-3/7 (Promega, G7791). En resumen, se remueven las placas de cultivo a partir del incubador y se permite equilibrar a temperatura ambiente por 20 minutos. 60 µl del substrato Apo-One y 6 ml de amortiguador se descongelan, se combinan y se agregan a las muestras (75 µl/pozo). Los contenidos de los pozos son suavemente agitados por 30

segundos y se protegen de la luz, se incuba en temperatura ambiente por 1 hora. Usando un lector de placa Victor (Perkin Elmer), la fluorescencia de cada pozo es medido en una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

La Figura 12 muestra resultados representativos de este experimento. Comparado con el anticuerpo de control isotípico, los anticuerpos 11B7 y 11D5 anti-AXL de rata antagonistas de la invención reducen la anti-apoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-AXL cl.7 cosechados en suero, y de esta forma induce la apoptosis. En contraste, los anticuerpos 2A1 y 11D7 anti-AXL de rata agonistas de la invención induce fuertemente anti-apoptosis de células NIH3T3-AXL cl.7 cosechadas en suero independientemente de la ausencia o presencia de Gas6, y por lo tanto inhibe la apoptosis.

Ejemplo 13. Los anticuerpos anti-aXL de rata de la invención inhiben la angiogénesis celular a base de esferoides *in vitro*

AXL es un regulador clave de comportamientos angiogénicos múltiples los cuales incluyen migración celular endotelial, proliferación y la formación de tubo *in vitro* (Holland et al., Cancer Res: 62, 9294-9303, 2005). Por lo tanto, los anticuerpos 11B7 y 11D5 monoclonales anti-AXL de rata de la invención son probados para efectos inhibitorios en brote de baso inducido por VEGF-A de esferoides HUVEC. Los experimentos son continuados en modificación del protocolo publicado originalmente (Korff and Augustin: J. Cell Sci 112:3249-58, 1999). En resumen, los esferoides son preparados como se describe (Korff and Augustin: J Cell Biol. 143:1341-52, 1998) por pipetear las células endoteliales de vena umbilical humano (HUVEC por sus siglas en inglés) en una gota

colgante en cajas petri de plástica para permitir durante la noche la agregación de esferoides. 50 esferoides HUVEC son entonces sembrados en 0.9 ml de una solución de colágeno (2 mg/ml) y se pipetea en pozos individuales de una placa de 24 pozos para permitir la polimerización. Concentraciones disminuidas de los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 ($1X10^{-8}$ M, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-8}$M, 1x10-9 M, $1x10^{-10}$ M) son mezcladas directamente en la solución de colágeno antes de la polimerización, mintras que el factor de crecimiento VEGF-a (concentración final 25 ng/ml) se agrega después de 30 minutos por pipetear 100 µl de una dilución de trabajo concentrada 10 veces en la parte superior del gel polimerizado. Las placas son incubadas en 37°C por 24 horas y se fijan por agregar 4% de paraformaldehído. La intensidad de brote de esferoides HUVEC es cuantificado por un sistema de análisis de imagen que determina la longitud de brote acumulativa por esferoide usando un microscopio invertido y el análisis de software de imagen 3.2 (Soft imaging system, Münster, Alemania). El promedio de la longitud de brote acumulativo de 10 esferoides seleccionados aleatoriamente es analizado como un punto de datos individuales.

Las Figuras 13A(a)-13B(b) muestran los resultados de este experimento. Los anticuerpos anti-AXL de rata antagonistas 11B7 (figura 13A(a)-13A(b)) y 11D5 (figura 13B(a)-13B(b)) de la invención inhiben el brote de HUVEC estimulado en VEGF-A en el ensayo de angiogénesis a base de esferoides en una forma dependiente a dosis. Mientras que el tratamiento con la concentración más alta de 11B7 reduce el brote de HUVEC a niveles basales, la inhibición con la concentración más alta de 11D5 no es efectiva (figura 13A(a) y

13B(a)). El brote HUVEC es inhibido con valores IC_{50} de 9.8 x 10^{-8} M y 7.0 x 10^{-7}M por 11B7 y 11D5, respectivamente (figura 13A(b) y 13B(b)).

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

La eficacia antitumoral de anticuerpos terapéuticos es con frecuencia evaluada en estudios tumorales de xenoinjerto humano. En estos sistemas modelo, los tumores humanos crecen como xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos y la eficacia terapéutica es medida por el grado de inhibición de crecimiento tumoral. El objetivo de este estudio es evaluar si el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista de la invención interfiere con el crecimiento de tumor de células de cáncer de próstata humanas en ratones desnudos. En resumen, en el día 0, se anestesian ratones macho $NMRI^{-un/un}$ de 7-8 semanas de edad (peso aproximada: 30 g después de la aclimatización) con 1.5-2.0 por ciento de volumen de isoflurano en una velocidad de flujo de oxígeno de 1 17min, y $1x10^6$ células PC-3-LN en 25 µl de PBS son implantados ortotópicamente en la próstata. Las células PC-3-LN son derivadas de la línea celular de carcinoma de próstata PC-3 la cual es infectada con un retrovirus que codifica para una proteína de fusión de lucíferasa-neomicina. El inicio del crecimiento tumoral y la progresión de crecimiento tumoral es por lo tanto medible por medio de imágenes de bioluminiscencia in vivo. Para este propósito, se inyecta la luciferina intraperitonealmente (i.p.) en los ratones y se mide la emisión de luz 10 minutos post-inyección usando un sistema de imagen de bioluminiscencia NightOWL L 981 (Berthold

Technologies, Alemania). Antes al primer tratamiento, se agrupan al azar los ratones y se realizan las pruebas estadísticas para asegurar la uniformidad para iniciar los volúmenes tumorales (promedio, media y desviación estándar) entre los grupos de tratamiento de 10 animales cada uno. En el día 8, todos los tratamientos inician y son continuados hasta el día 34, seguido por necropsia en el día 35. 25 mg/kg del anticuerpo 1D5 de control isotípico y el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista son administrados intraperitonealmente (i.p.) 3x una semana (lunes, miércoles, viernes) en animales de grupo 1 y 2, respectivamente. Animales del grupo 3 reciben oralmente (p.o.) 40 mg/kg de Sutent una vez al día. Los animales del grupo 4 reciben tres inyecciones intravenosas (i.v.) con 12.5 mg/kg de Taxotere 4 días una de la otra. Un resumen de los grupos de tratamiento es dado posteriormente.

Grupo		Tratamiento	Aplicación		Numero de animal
			Ruta	Esquema	
1	1D5	25 mg/kg	i.p.	3 veces por semana (Lunes, Miércoles, Viernes) Empezando un día después del agrupamiento aleatorio[2)]	10
2	11B7	25 mg/kg	i.p.	3 veces por semana (Lunes, Miércoles, Viernes) Empezando un día después del agrupamiento aleatorio[2)]	10
5	Sutent	40 Mg/kg	p.o.	Diariamente Empezando un día después del agrupamiento alatorio[2)]	10
6	Taxotere	12.5 mg/kg	i.v.	Diariamente Empezando un día después del agrupamiento aleatorio	10

La Figura 14 muestra los resultados de este experimento. Comparado con el anticuerpo 1D5 de control isotípico, el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista de la invención reduce el crecimiento total de tumores de próstata PC-3-LN en ratones desnudos.

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

En el mismo experimento como se describe bajo los "anticuerpos anti-AXL de rata de la invención reducen el crecimiento de carcinoma de próstata humano en ratones desnudos", la reubicación de células tumorales PC-3-LN en otros órganos (metástasis) es analizado post necropsia para evaluar los efectos anti-metastáticos del anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista de la invención. Para este propósito, los órganos seleccionados (hígado, bazo, pulmones, fémur, parte de la espina lumbar) son recolectados post necropsia, homogenizado y complementado con luciferina. Subsecuentemente, se mide la emisión de luz usando un sistema de imagen de bioluminiscencia NightOWL LB 981 (Berthold Technologies, Alemania).

La Figura 15 muestra los resultados de este experimento par el análisis de bazos. Comparado con el anticuerpo de control isotípico 1D5, el anticuerpo anti-AXL de rata antagonisto 11B7 de la invención reduce la ocurrencia de metástasis de bazo. De particular interés, el efecto anti-metastásico de 11B7 en este experimento es más fuerte que aquel de Sutent. Observaciones similares son obtenidas para metástasis de espina de hígado, pulmón, fémur y lumbar.

Ejemplo 16. AXL es expresado predominantemente en tumor más que el tejido normal adyacente

En este estudio, la expresión AXL en 17 malignidades humanas diferentes es analizada inmunohistoquímicamente en tejidos embebidos en parafina fija en formalina en formato de multidisposición de tejido. Para cada tipo de tumor, los pares de tejido de tumor y acoplamiento tejido no maligno son examinados. En resumen, el tejido es fijo por 16 horas a 20 horas en 4% de formalina amortiguada neutral y se embebe en parafina. Para construcción de una microdisposición de tejido de 60 núcleos (TMA), una perforación de tejido sano y una perforación de tejido tumoral correspondiente de cada caso es elegido por un patólogo. Un TMA de 96 núcleos con perforaciones de tejido de control normal (tres de cada tipo de tejido) es generado con respecto a pautas de FDA. Cada perforación tiene 1.5 mm en diámetro.

Con un microtomo, secciones de 2-4 µm de bloques de tejido seleccionados son cortados, se montan en portaobjetos de vidrio silanizadas (Sigma) y se secan en 60°C por 30 minutos y 38°C durante la noche. Las secciones son eliminadas de la parafina por incubación en un baño de xileno por 6 minutos dos veces, en acetona por 5 minutos dos veces y finalmente en agua destilada por 5 minutos. El pretratamiento de calor de las secciones es realizado en 10 mM de amortiguador de citrato, pH 6.0 en un vaporizador por 30 minutos, seguido por lavado en agua destilada. La peroxidasa endógena es bloqueada por incubación con una solución preparada recientemente de 0.3% de H_2O_2 en metanol por 20 minutos en temperatura ambiente, seguido por lavado con agua destilada y PBS por 5 minutos cada uno. Las secciones son

incubadas con anticuerpo AXL anti-humano de cabra policlonal (Santa Cruz SC-1096) por 60 minutos (1:20 dilución en TBST) en temperatura ambiente. Después de tres lavados en TBST, las secciones son incubadas con anticuerpo secundario anti-cabra de conejo bioestañado (Dianova, 1:200 de dilución en TST) por 45 minutos en temperatura ambiente. Después de lavar como antes, se incuban las secciones con estreptavidina/HRP (DAKO, 1:300 dilución en TBST) por 30 minutos en temperatura ambiente, seguido por lavar como antes. La tinción se logra con solución DAB (DAKO; 1:50 dilución en amortiguador de substrato) por 10 minutos en temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos son enjuagados con agua, se contratiñen con hematoxilina de Harris, y se cubre con un portaobjetos de vidrio. Las secciones de control son incubadas con anticuerpo de control IgG de cabra (R&D) en lugar de anticuerpo primario anti-AXL.

Las Figuras 16A-16B resumen los resultados de este análisis en expresión de AXL en 17 tumores sólidos humanos diferentes y tejido no maligno correspondiente (figura 16A). Entre todos los casos tamizados para cada indicación, se detecta la expresión no marcada en linfoma folicular, cáncer de próstata (excepto para células individuales), y en cáncer de riñón. Los tumores celulares de melanoma y Merkel muestran expresión muy baja de AXL. Se observa una expresión débil en unos cuantos tumores del pulmón, principalmente adenocarcinomas. Los tumores de esófago y Barret, tumores ováricos, colon y pancreáticos así como también tumores de hígado (carcinoma hepatocelular) muestra tinción débil en aproximadamente 30% de los casos. Los tumores de cabeza y cuello muestran tinción débil a moderada en aproximadamente

40% de los tumores. Se detecta tinción débil a moderada en 60% a 100% de los tumores analizados de mama, cuello del útero, vejiga, tiroides y el estómago. Se observa tinción más intensa en tumores mamíferos y en un carcinoma de célula de anillo de sello del estómago (figura 16B). Los tejidos no malignos principalmente no muestran tinción específica excepto a partir de túbulos del riñón el cual a veces muestra tinción débil sobre los antecedentes.

Ejemplo 17: Estructura y Características de anticuerpos anti-AXL

17A Las secuencias de nucleótido de dominios variables de anticuerpo de rata

Se clonan los dominios variables de anticuerpo anti-AXL de rata a partir de células de hibridoma. Se prepara el ARN utilizando el kit Rneasy de extracción de ARN (Rneasy midi-kit, Qiagen). El ADNc que codifica para los genes de anticuerpo es preparado usando el kit 5´RACE (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

Brevemente, se sintetiza la primera cadena de ADNc a partir de ARN o total usando los cebadores GSP1 específicos a genes y SuperScript™ II transcriptasa inversa. Después de la síntesis de la primera cadena ADNc, el templado de ARNm original es removido por tratamiento con la mezcla RNAse. Se agrega una cola homopolimérica entonces al extremo 3´ del ADNc. La amplificación de PCR es realizada usando ADN Taq de polimerasa, un cebador específico a gen de nido (GSP2) que templa a un sitio ubicado dentro de la molécula de ADN y un cebador de anclaje proporcionado con el kit. Después de la amplificación los productos 5´RACE se clonan en el vector pLXS N-ESK para secuenciación. Para facilitar la clonación el

cebador de anclaje (AP) incluye una secuencia de reconocimiento para Sai I, los cebadores GSP2 contienen un tamaño XhoI.

Cebador GSP1:

Kappa_GSP1: GATGGATGCATTGGTGCAGC

New_kappa_GSP1: ATAGATACAGTTGGTGCAGC

Heavy_GSP1: CAGGGTCACCATGGAGTTA

Cebador GSP2:

Xhol-hGSP2: CCGCTCGAGCGGGGGATAGACAGATGG

Xhol-kGSP2: CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

La utilización de los cebadores GSP para clonación Mab anti-AXL de rata

11B7: kappa GSP1; Xhol-kGSP2

GSP1 pesado; Xhol-hGSP2

10D12: kappa_GSP1, new_kappa_GSP1: Xhol-kGSP2

GSP1 pesado: Xhol-hGSP2

11D5: new_kappa_GSP1; Xhol-kGSP2

GSP1 pesado; Xhol-hGSP2

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

Las secuencias de dominio variable de anticuerpo de rata son traducidas de los genes clonados secuenciados en los vectores pLXSN-ESK. Las secuencias de aminoácidos dadas inician en la posición uno del dominio variable. Las regiones determinantes complementarias (CDR) requeridas para el enlace específico del anticuerpo a su objetivo son definidas de acuerdo a Kabat (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición. No. de publicación NIH 91-3242, 1991). La definición Kabat se basa en la variabilidad de secuencia dentro de los dominios variables. Las regiones

CDR específicas anti-AXL de los anticuerpos son listadas en la SEQ ID NO:13-30. Las CDR individuales incluyen las siguientes posiciones:

CDR-L1: 24-34

CDR-L2: 50-56

CDR-L3: 89-97

CDR-H1: 31-35b

CDR-H2: 50-56

CDR-H3: 95-102

17C Expresión y purificación de anticuerpo de rata

Se cultivan los hibridomas en bioreactores Celline CL 1000 (Integra Biosciences) en 37°C, 5-7% de CO_2 usando DMEM el cual incluye 4.5 g/l de glucosa; 1% de glutamina, 1% de piruvato 1% de Pen/Strep. El complemento con FCS es 1% de FCS para el compartimiento de nutrientes y 5% de IgG FCS bajo para el compartimiento celular. La cosecha y el intercambio de medios se realiza dos veces a la semana. La célula se divide 1/1 → 1/3 dependiendo del crecimiento celular. La productividad se prueba una vez a la semana por medio de análisis SDS-PAGE. Los sobrenadantes son almacenados en -20°C hasta purificación. La prueba de micoplasma de cultivos corridos es hecha una vez a la semana.

Los anticuerpos son purificados usando Proteína A o G Sepharose FF (GE-Healthcare) por medio de Akta Explorer 100 System (GE-Healthcare). Las columnas son empacadas individualmente para cada purificación. El tamaño de columna es ajustado a la productividad esperada y tamaño de cada lote (usualmente 50- 500 mg). Las soluciones que contienen proteína son mantenidas en hielo o en 4°C donde sea posible. Los amortiguadores estériles y agua doblemente destilada son

usados para el proceso completo.

Los sobrenadantes son descongelados, amortiguados con 50 mM TRIS pH 8.5, centrifugados, filtrados a través de una memorana 0.22 µm y se cargan en la columna. Después se lavan con 8 volúmenes de columna (CV) 50 mM PO_4, pH 8.5 el anticuerpo es eluido dentro de 10 CV 100 mM Glycin, pH 3.3. Las fracciones de eluido son otra vez amortiguadas inmediatamente a pH neutral por agregar 1/5 1M Tris pH 8.0 (1 ml Tris por 4 ml de fracción eluida) y se analiza por rSDS-PAGE subsecuentemente. Las fracciones que contienen anticuerpo puro son agrupadas, dializadas contra PBS en 4°C y se filtran estérilmente.

Los requerimientos del sistema de amortiguador son ajustados de acuerdo a las propiedades individuales de cada anticuerpo. En particular, el anticuerpo 11D5 de IgG2a de rata es enlazado a la matriz de ProteinG 4 FF (GE-Healthcare) y se lava bajo condiciones concentradas en sal (NaCl 2M). El anticuerpo IgG1 11B7 de rata es purificado por medio de rProteinA (GE-Healthcare) bajo condiciones concentradas en sal de acuerdo a 11D5. La elución del anticuerpo es realizada en pH 5.5. La velocidad de flujo para purificación de anticuerpo de rata tiene que ser mantenida baja para incrementar la eficiencia del enlace.

Como una segunda etapa de purificación ya sea la cromatografía de intercambio de iones (bajo condiciones individuales, adecuadas) o cromatografía de exclusión de tamaño preparativo (PBS, pH 7.4) pueden ser implementadas.

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

- análisis de gel rSDS-PAGE; teñido con Coommassie o

plata

- prueba BCA (Pierce #23227 BCA kit de ensayo de proteína BCA; estándar IgG de rata #31233)
- Exclusión de tamaño analítica (Superdex 200 Tricorn 10/300 GL, ~250 mg en 250 µl; 0.5 ml/mmin, Akta Explorer 100)
- Prueba de endotoxina (LAL, Cambrex QCL-1000® ensayo de punto final de Chromogenic LAL #US50-648U)
- Ensayos de actividad a base de células (enlace FACS: pAkt; pAXL)

Los anticuerpos purificados son almacenados en PBS, pH 7.4, bajo condiciones estériles en 4°C ó -20°C dependiendo de su estabilidad.

17D. Determinación de afinidad de anticuerpo por FACS Scatchard

Se cosechan las células NIH3T3 de sobreexpresión de AXL humano por incubación con 10 mM de EDTA en PBS y se vuelven a suspender en 6 millones de células por ml en amortiguador FACS (PBS pH 7.4, 3% de FCS, 0.1% de NaN_3). En una placa de microtítulo de línea inferior redondo, 100 µl de suspensión celular se agregan a 100 µl de solución de anticuerpo la cual contiene los anticuerpos 11B7, 11D5, ch11B7-IgG2 ó ch11D5-IgG2 en concentraciones entre 40 y 0.002 µg/ml (266 y 0.01 nM) en amortiguador FACS. Se permite que proceda el enlace de anticuerpo por 2 horas en hielo. Entonces, se lavan las células dos veces con 250 µl de amortiguador FACS por pozo, y se vuelven a suspender en 200 µl de anticuerpo secundario (anti-rat-PE; Jackson) diluido 1:50 en amortiguador FACS. Después de 45 minutos de incubación, las células son lavadas otra vez dos veces en amortiguador FACS y

se vuelven a suspender en 500 ml de PBS para análisis FACS. El análisis se lleva a cabo en un Beckman-Coulter FACS FC500. Para determinar la constante de afinidad evidente K_{Dapp}, se grafican los valores de fluorescencia media contra la proporción de fluorescencia media y la concentración de anticuerpo correspondiente ((M)). Se enlista a continuación las K_{Dapp} calculadas a partir de la pendiente inversa de la línea recta:

Clon	Valor K_D (nM)
11B7	0.38
Ch11B7-IgG2	0.6
11D5	0.81
Ch11D5-IgG2	0.9

18. Quimerización de los anticuerpos anti-AXL de rata

Los genes IgG1/2 de cadena ligera y cadena pesada kappa humanas son clonados de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) de un voluntario humano como se describe posteriormente:

Se preparan las PBMC a partir de sangre entera: se diluye la sangre 1/2,5 en PBS/EDTA 2mM con 10 U/ml de heparina en RT, se estratifica sobre 15 ml de solución Biocoll cubierta por un diafragma (35 ml/tubo) (Biocoll de Biochromm #L6115). Las muestras se centrifugan en RT por 30 minutos en 400 xg y se desecha el suero (~15 ml). La interfase que contiene PBMC es recuperada cuidadosamente usando una pipeta Pasteur. Se lavan los PBMC 2 x en PBS/EDTA 2 mM (primer lavado 100 ml, segundo lavado 50 ml) y se agita en 300 xg por 10 minutos. Se vuelve a suspender el gránulo celular en RPMI/FCS al 10% (25 ml) y produce $5.5x10^7$ PBMC.

Se prepara el ARN a partir de PBMC usando un kit

Rneasy de Qiagen (#75142) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se almacena el ARN purificado (30 µg) en alícuotas en -80°C.

El ADNc para anticuerpo IgG gamma 1 y 2 así como también las cadenas kappa son preparadas de ARN aisladas por RT-PCR usando transcriptasa inversa Superskript III (invitrogen # 18080-93) de acuerdo a las instrucciones de fabricante usando los cebadores siguientes:

1) RT-gamma: GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG
2) RT-gamma2: GGG CTT GCC GGC CGT G
3) RT-kappa: TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG
4) 5´Blp: AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT
5) 3´Bam (GAG): AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G
6) 6´Bsi: AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT
7) 3´Bam (CTT): AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT

Se disuelven los cebadores en 100 µM. Se realizan las reacciones RT-PCR usando 2pmol de oligo RTγ y RTκ respectivamente, agregando 1 µg de ARN, 10 mM de mezcla dNTP y se calienta por 5 minutos a 65°C. 4 µl de amortiguador de primera cadena, 1 µl de DTT 0.1M, 1 µl de inhibidor de Rnase (40 U/µl Fermentas #EO0311) y 2 µl de Superscript III RT se agregan, se mezclan y se incuban en 50°C por 1 hora seguido por una etapa de inactivación de calor por 15 minutos en 70°C.

2 µl de la primera reacción en cadena se usan para la segunda etapa de PCR usando Taq polimerasa (Eurochrom # EME010001) para producir ADN de doble cadena de dominios

constantes de anticuerpos. Se usan el cebador 5´Blp y 3´Bam (GAG) para amplificar la cadena γ y se usan 5´Bsi y 3´Bam (CTT) para amplificar las regiones de constantes de cadena κ usando las siguientes fijaciones PCR:

amplificación de cadena κ

94°C 120 segundos

94°C 30 segundos

55°C 30 segundos

72°C 45 segundos ciclo 35 veces

72°C 10 minutos

amplificación de cadena γ

94°C 120 segundos

94°C 30 segundos

45°C 30 segundos

72°C 60 segundos ciclo 5 veces

94°C 30 segundos

50°C 30 segundos

72°C 6 segundos ciclo 35 veces

72°C 10 minutos

Se analizan los productos PCR en un gel de agarosa al 2% amortiguado con TAE. Una sola banda de ~350 pb para la cadena ligera kappa y una sola banda de ~1000 pb para las cadenas pesadas γ1 y γ2 son encontradas. Los productos PCR son purificados por kit de extracción de gel Qiagen (QIAGEN, #28784) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para clonar los fragmentos de PCR en el sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3 (Invitrogen), vector pcDNA3 y fragmentos PCR son digeridos con endonucleasas de restricción HindIII (5´) y BamHI (3´). Los sitios de restricción son codificados dentro de los cebadores PCR. Los fragmentos digeridos son purificados

usando el kit de purificación Qiagen PCR (QIAGEN 28104) y ADN el cual codifica las cadenas γ1, γ2, κ son ligadas en el vector pcDNA3 el cual facilita la ADN ligasa T4 en 16°C durante la noche. La ligasa es inactivada por 10 minutos en 65°C. Los plásmidos de ADN ligados son transformados directamente en *E. coli* competente con $CaCl_2$ usando protocolo estándar y se coloca en placas en placas Lb que contienen ampicilina. Después de la incubación en 37°C durante la noche se toman colonias sencillas, se suspenden en 10 µl de H_2O y se prueban para contener la cadena de anticuerpo respectivo que porta plásmido por PCR (5 µl células suspendidas, Taq polimerasa, cebador 5Bip y 3Bam (GAG) γ1/γ2 y 5Bsi y 3Bam (CTT) para colonias κ:

94°C 120 segundos

94°C 30 segundos

55°C 60 segundos ciclo 35 veces

72°C 10 minutos

Se analizan las muestras en 1.5% de gel de agarosa para productos PCR. Las colonias que contienen el gen de anticuerpo son seleccionadas para inocular 5 ml de medio Lb/ampicilina. Después de la incubación en 37°C durante la noche se cosechan *E. coli* y se prepara el ADN usando el kit Qiagen miniprep (QIAGEN, #12123). Una digestión de control (HindIII, BamHI) muestra todas las inserciones de gen de cadena κ y γ en el tamaño esperado; se verifican las secuencias por secuenciación de ADN en Medigenomix.

Se amplifican los dominios variables de rata por PCR a partir de vector pLXSN-ESK y se clonan en vectores g1/g2 y k pcDNA3 para producir los anticuerpos de longitud completa quiméricos. Se amplifican los dominios VL variables con los

siguientes cebadores, los cuales contienen un sitio HindIII y Bsml en el extremo 5´ y un sitio BsiWI en el extremo 3´:

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

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

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

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

Se amplifican los dominios VH variables con los siguientes cebadores, los cuales contienen un sitio HindIII y Bsml en el extremo 5´ y un sitio Blpl en el extremo 3´:

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

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

BsiWI para la cadena ligera y BipI para la cadena pesada son sitios sencillos en el extremo 5´ de las regiones constantes para permitir la fusión directa con el extremo 3´ de los genes de dominio variables.

Fusionados a la secuencia líder SEQ ID NO: 69 derivados del vector pLNOH2 (Norderhaug et al., J. Immunol. Methods 204, 1997: Neuberger EMBO J. 1983; 2(8): 1373-8, 1983) son clonados genes que codifican las cadenas de anticuerpo quiméricas en el sistema de vector pCEP para expresión recombinante. Los genes de cadena ligera son clonados Nhel (5´) y Xhol (3´) en pCEP4 (Invitrogen) genes de cadena pesada (5´) y Xhol (3´) en pCEP-Pu (Kohfeld FEBS Vol 414; (3) 557f, 1997).

Las células HEK 293 sembradas en placas 20 x 20 son

cotransfectadas con 1 µg/ml de cada plásmido el cual codifica para genes de cadena ligera y pesada usando método de transfección de $CaPO_4$ estándar para expresión temporal. Las condiciones de cultivo son 37°C, CO_2 al 5% en medio concentrado en glucosa DMEM/F12 el cual contiene 5% de IgG FCS bajo, 1% de pirovato, 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina. 24 horas después de que el medio de transfección es intercambiado por medio fresco. Se recolectan los sobrenadantes cada 2-3 días por aproximadamente 3 semanas. Los anticuerpos quiméricos son purificados a partir de aproximadamente 600 ml sobrenadante utilizando 1 ml de columnas Hitrap rProtein (GE-Healthcare) bajo condiciones de amortiguado estándar (carga: 50 mM Tris; pH = 8.5, lavado: 50 mM PO_4; pH= 8.5, elución: gliclina 100 mM; pH 3.3) como se describe para la purificación de anticuerpo de rata.

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

Las regiones variables de rata de los anticuerpos quiméricos son comparadas a secuencias de línea germinal de anticuerpo humano en el nivel de proteína por medio de una búsqueda BLAST para dominios de inmunoglobulina. La contraparte humana más cercana dentro de los genes V, en el cual la adición tiene longitudes de circuito CDR idénticos es identificado. Los segmentos D y J asociados son seleccionados de la base de datos V-BASE (http://vbase.mrc-cpe.cam-ac.uk/) de acuerdo a su homología a las secuencia de rata en un procedimiento de análogo.

Para los dominios variables de rata de los anticueros 11B7 y 11D5 se encuentran las siguientes secuencias de línea germinal humana de mejor fijación (segmentos V, D y

J) y se definen como cuadro humano:

VL11B7hum: Vκ1-012 ´Jk1

VH11B7hum: VH4-59 + D4-4 (cuadro de lectura 3) + JH4

VL11D5hum: Vκ1-L1 + Jκ4

VH11B5hum: VH4-59 + D4-4 (cuadro de lectura 3) + JH4

Las secuencias líder para los dominios variables humanizados son adoptadas a partir de las secuencias de genes V de línea germinal asociadas como se selecciona. Los residuos CDR de anticuerpos anti-AXL de rata definidos de acuerdo a Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interes, quinta edición, no. de publicación NIH 91-3242, 1991) son injertados en cuadros de línea germinal humanos para especificidad anti-AXL para obtener la versión humanizada final de anticuerpos anti-AXL hum11B7 y hum11D5.

Las secuencias de proteína de los anticuerpos anti-AXL humanizados hum11B7 y hum11D5 son como a continuación:

Las secuencias de proteína son traducidas de nuevo en secuencias de ADN. Las secuencias de ADN son optimizadas por CODON para expresión recombinante en células mamíferas usando la base de datos Kazusa-Codon-Usage. Las secuencias de ADN resultantes para los anticuerpos anti-AXL humanizados son como a continuación:

Las secuencias de ADN optimizadas que codifican los anticuerpos anti-AXL humanizados son sintetizadas por un método PCR a base de oligonucleótidos de traslape.

Se clonan los genes VL en el vector pCEP4 utilizando el plásmido de la construcción de anticuerpo quimérico pCEP4_ch11B7k1. Los sitios de clonación son Nhel (5´) y BsiWI (3´) los cuales son ya incluidos en los genes sintetizados de los anticuerpos humanizados. Los genes VH son clonados en el

vector de cadena pesada quimérica correspondiente pCEP-PU_ch11B7g1 utilizando KpnI (5´) y BlpI (3´) como sitios de restricción. La optimización de ADN, síntesis de genes, clonación y verificación de secuencia se realiza en Eurofins Medigenomix GMBH, Martinsried, Alemania.

Ejemplo 20: Los anticuerpos anti-AXL quiméricos y de rata de la invención inhiben la fosforilación AXL inducida por ligando *in vitro* a grado similar

Los derivados quiméricos de los anticuerpos anti-AXL de rata 11B7 y 11D5 son generados como parte de esta invención (ver posteriormente). Con el fin de investigar si los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención y los anticuerpos anti-AXL quiméricos correspondientes son capaces de inhibir la activación AXL mediada por ligando Gas6 *in vitro* a un grado similar, se realizan los experimentos ELISA en las células de cáncer del cuello del útero CaSki. La activación AXL mediada por Gas6 es por lo mismo detectada por fosforilación de tirosina receptora incrementada. En resumen, en el día 1 se siembran $3x10^4$ células por pozo en medio de crecimiento normal en placas de 96 pozos de línea inferior plano. Al día siguiente, se reemplaza el medio por medio libre de suero para cosechar las células durante la noche por 24 horas. También durante la noche, las placas de 96 pozos Maxi-Sorp negras (Nunc) son recubiertas con anticuerpo anti-fosfo-tirosina de ratón 4G10 en 2 µg/ml de PBS y 4°C. En el día 3, la solución de anticuerpo 4G10 es removida y se bloquean los pozos Maxi-Sorp con PBS, 0.5% de BSA por al menos 4 horas en temperatura ambiente. En paralelo, las células son preincubadas con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml de anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata o anticuerpo ch11B7 anti-AXL

quimérico por 1 hora en 37°C y se trata subsecuentemente con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R&D Systems) por 10 minutos en 37°C. Se remueve entonces el mdio y se lisan las células en amortiguador de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.5, 150 mM de NaCl, EDTA 1 mM, 10% de glicerina, y 1% de Triton X-100) complementado con fosfatasa e inhibidores de proteasa ($Na_4P_2O_7$ 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 mM de ortovanadato, NaF 1 mM, y aprotinina al 0.5%) por 30 minutos en hielo. Mientras tanto, se remueve el amortiguador de bloqueo y se lavan las placas Maxi-Sorp 6x con amortiguador de lavado (PBS, 0.05% de Tween 20), antes de que se transfieran los lisados y se incuben durante la noche en 4°C. Después se lavan las placas 6x con amortiguador de lavado en el día 4, se incuban los pozos con anticuerpo anti-AXL de rata bioestañado 12B7 en 0.5 µg/ml PBS por 2 horas en temperatura ambiente. Las placas se lavan 6x con amortiguador de lavado y se agrega estreptavidina conjugada a AP (Chemicon #SA11) diluida 1:4,000 en PBS a cada pozo y se incuba por 30 minutos en temperatura ambiente. Después de esto, se lavan los pozos 6x con amortiguador de lavado y se agrega solución de substrato AttoPhos (Roche #11681982). Usando un lector de placa Victor (Perkin Elmer), se recolecta la fluorescencia de cada pozo en una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

Las Figuras 17A-17B muestran los resultados representativos de este experimento para la línea celular de cáncer del cuello del útero CaSi. Como se demuestra por la disminución dependiente a concentración de la fosforilación de AXL relativa, el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata (figura 17A) y el anticuerpo ch11B7 (figura 17B) anti-AXL quimérico de la

invención son capaces de bloquear la activación inducida por ligando del receptor de tirosina quinasa Axl a un grado similar. Los efectos comparables que aplican a las mismas fijaciones experimentales son observadas con la línea celular de melanoma C-8161.

Ejemplo 21. Anticuerpos anti-AXL quiméricos y de rata de la invención inhiben la fosforilación de MAP-quinasa p42/p44 inducida por ligando *in vitro* a un grado similar

Para verificar si adicionalmente los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención y los anticuerpos anti-AXL quiméricos correspondientes de la invención son también capaces de inhibir la activación inducida por Gas6 de p42/p44 MAP-quinasa en células de cáncer del cuello del útero CaSki a grado similar, se realizan los experimentos ELISA. Aquí, la activación de MAP-quinasa p42/p44 inducida por Gas5 se detecta por fosforilación de proteína incrementada (Thr202/Tyr204). En resumen, en el primer día, $2x10^4$ células por pozo se siembran en placas de 96 pozos de línea inferior plano. Al día siguiente, se reemplaza el medio de crecimiento normal por medio libre de suero para cosechar células por 24 horas. Después de lo mismo, las células son pre-incubadas con 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1 µg/ml, y 10 µl/ml de anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata ó anticuerpo ch11B7 anti-AXL quimérico por 1 hora en 37°C y entonces se trata con o sin 400 ng/ml de Gas6 (R & D Systems) por 10 minutos en 37°C. Se remueve el medio y se fijan las células con 4% de formaldehído en PBS (pH 7.5) por 30 minutos en temperatura ambiente. La solución de formaldehído se remueve y las células se lavan dos veces con amortiguador de lavado (PBS, 0.1% de Tween 20). Las células son detenidas con 1% de H_2O_2. 0.1% de NaN_3 en

amortiguador de lavado y se incuba por 20 minutos en temperatura ambiente. Después de esto, se remueve la solución de detención y se lavan dos veces las células con amortiguador de lavado y se bloquean con PBS, 0.5% de BSA por 4 horas en temperatura ambiente. El anticuerpo primario MAP quinasa anti-fosfo-p42/p44 (Thr202/Tyr204) (conejo policlona: señalización celular #9101) diluido 1:1,000 en PBS, 0.5% de BSA, 0.05% de Tween 20, EDTA 5 mM es agregado durante la noche en 4°C. En el día 4, se remueve la solución de anticuerpo y se lava la placa 3x con amortiguador de lavado. El anticuerpo secundario anticonejo conjugado a HRP (Dianova #111-036-045) diluido 1:2,500 en PBS, 0.5% de BSA, 0.05% de Tween 20, EDTA 5 mM es entonces agregado a cada pozo y se incuban por 1.5 horas en temperatura ambiente. La placa se lava 3x con amortiguador de lavado por 5 minutos cada uno. Se agrega tetrametilbencidina (TMB, Calbiochem) y se monitorea en 620 nm. Se detiene la reacción por adición de 100 µl de 250 nM de HCl y se lee la absorbancia en 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm usando un lector de placa Vmax (Thermo Lab Systems).

Las Figuras 18A-|18B muestra resultados representativos de este experimento. El anticuerpo anti-AXL de rata 11B7 (figura 18A) y el anticuerpo anti-AXL quimérico ch11B7 (figura 18B) de la invención son capaces de bloquear la activación inducida por Gas6 de p42/p444 MAP-quinasa en células cancerígenas cervicales CaSki a un grado similar como se indica por la disminución dependiente a concentración de la fosforilación de MAP-quinasa p42/p44 relativa.

Ejemplo 22. Los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención forman sinergia con agentes quimioterapéuticos para solucionar

la resistencia de fármaco *in vitro*

En cuanto los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención cambian para interferir con la anti-apoptosis mediada por Gas6 de fibroblastos NIH3T3-Axl cl.7 cosechados con suero, se origina la pregunta, si los anticuerpos anti-AXL antagonistas pueden formar sinergia con agentes quimioterapéuticos para inducir la apoptosis, por lo mismo contribuyendo a solucionar la resistencia a fármacos. En este ejemplo, las células NCl/ADR-RES (nombradas originalmente MCF-7/AdrR)- línea celular de cáncer ovárico (Liscovitch and Ravid, 2007, Cancer Ltters, 245, 350-352) que exhiben un alto nivel de resistencia a varios agentes incluyendo doxorubicina (Fairchild et al., 1987, Cancer Research, 47, 5141-5148, Xu et al., 2002, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302, 963-971) - son incubadas con el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista y/o doxorubicina, y las proporciones de apoptosis son determinadas por tinción de TUNEL. En resumen, $3x10^4$ células NCI/ADR-RES en medio de crecimiento normal son sembradas por pozo de un portaobjetos de cultivo de 8 cámaras (BD Falcon, Cat# 354118) el cual es pre-incubado con el mismo medio por 1 hora en 37°C. A la siguiente mañana, se remueve el medio de crecimiento normal y las células se lavan con y se cultivan en medio reducido en suero (0.5% de FCS). En la tarde, el anticuerpo de control isotípico 1D5 o el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista son agregados a las concentraciones finales de 10 µg/ml cada uno. En la mañana del día 3, se agrega la doxorubicina en concentraciones finales de 100 µM, 150 µM, ó 200 µM, y se incuban las células en 37°C. Después de 24 horas, se enjuagan las células una vez con PBS, se fijan con 4% de formaldehído en PBS (pH 7.5) por

20 minutos en temperatura ambiente, se secan al aire por 5 minutos, y se almacenan en -20°C. Usando el kit Fluorescein-FragEL™ disponible comercialmente (Oncogene, cat#QIA39, actualmente distribuible a través de Merck-Calbiochem), se realiza la tinción TUNEL de acuerdo a las instrucciones del manual del proveedor (capítulo "Fluorescein-FragEL™ de las preparaciones celulares fijadas en portaobjetovs, página 10). Aplicando la microscopía de fluorescencia, se analizan las células y se toman las fotos.

La Figura 19 muestra resultados representativos de este experimento. Ninguna tinción TUNEL, y por lo tanto ninguna apoptosis, se observa con las células de cáncer de ovario NCl/ADR-RES que son tratadas con 100 μM de doxorubicina, independientemente de si las células han sido coincubadas con anticuerpo de control o el anticuerpo anti-AXL antagonista 11B7 (línea superior). Sin embargo, en una concentración de 150 μM de doxorubicina, solamente apoptosis de muchas semanas puede ser detectada en las células cotratadas con anticuerpo de control, mientras que la coincubación con el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista resulta en una inducción substancial de apoptosis (línea media). También en la presencia de 200 μM de doxorubicina, la co-incubación de las células con 11B7 incrementa significativamente las proporciones de apoptosis como se compara con las células que son incubadas con anticuerpo IgG de control (línea inferior), indicando que el co-tratamiento de incluso múltiples células resistentes a fármacos con ambos agentes quimioterapéuticos y anticuerpos anti-AXL antagonistas de la invención pueden ser adecuados para solucionar la resistencia a fármacos.

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

Se realizan los ensayos de agar suaves con el fin de investigar la capacidad de los anticuerpos anti-AXL de la invención para inhibir el crecimiento celular independiente a anclaje ya sea solo o en combinación con los agentes quimioterapéuticos. El ensayo de formación de colonias de agar suave es un ensayo *in vitro* estándar para probar las células transformadas, ya que solamente las células transformadas son capaces de crecer en agar suave.

En resumen, las células de melanoma 750 C-8161 ya sea si permanecen no tratadas o son preincubadas con el anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista en 15 µg/ml en medio IMDM (Gibco) por 30 minutos en 37°C. Subsecuentemente, las células son combinadas con solución de agar Difco noble lo cual resulta en 50 µl de suspensión celular de agar superior en concentraciones de Agar, FCS, y 11B7 de 0.35% , 0.2% y 7.5 µg/ml, respectivamente. Esta suspensión celular es colocada en placa en la parte superior de 50 µl de 0.7% de capa de línea inferior de agarosa la cual contiene 20% de FCS, y se cubre finalmente con otros 50 µl de una solución de capa de alimentación que contiene 0.2% de FCS así como también cisplatina de acuerdo a las concentraciones. En el total de 150 µl por muestra, las concentraciones finales de 11B7 y cisplatina son 2.5 µg/ml y 1.5 µM, 1.0 µM, 0.75 µM, 0.5 µM, ó 0.25 µM, respectivamente. Se permite que se formen las colonias por 5 días y son teñidas entonces con 50 µl de MTT (Sigma, 1 mg/ml en PBS) por 3 horas en 37°C. Usando un sistema de cámara HTS Scanalyzer junto con el software de formación de

colonias HTS Bonit (Lemnatec, Wuerselen), se analiza el efecto del anticuerpo 11B7 anti-AXL de rata antagonista en la ausencia o presencia de cisplatina por triplicado.

Las Figuras 20A-20B muestran resultados representativos de este experimnto. Los datos presentados se refieren al área total de colonias y reflejan tanto los números absolutos que son medidos (figura 20A) y la inhibición de crecimiento relativa (figura 20B) ejercida por cisplatina y/o los anticuerpos anti-AXL 11B7 antagonistas. Como se compara con células de control no tratadas, la incubación con cisplatina lleva a la retardación de crecimiento de colonias en una forma dependiente a dosis. En línea con el efecto inhibitorio de 11B7 solo en el intervalo de 30%, la combinación con el anticuerpo 11B7 anti-AXL antagonista resulta en un efecto inhibitorio significativamente potenciado de cisplatina en crecimiento de agar suave de células de melanoma C-8161, particularmente en concentraciones menores de cisplatina.

Ejemplo 24. Los anticuerpos anti-AXL de rata de la invención forman sinergia con agentes anti-neoplásticos para reducir los fenómenos relacionados a tumor

En los ejemplos previos, los efectos sinergísticos de anticuerpos anti-AXL antagonistas de la invención coadministrados con doxorubicina han sido observados con respecto a inducción de apoptosis y solucionar la resistencia a fármaco en células cancerígenas resistentes a múltiples fármacos tales como la línea celular de cáncer de ovario NCI/ADR-RES. Por otra parte, los efectos de combinación de

anticuerpos anti-AXL antagonista de la invención y cisplatina para reducir el crecimiento de colonias independiente a anclaje son detectados con la línea celular de melanoma C-8161. Por lo tanto, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, supresión de sobrevivencia de células tumorales, inhibición de crecimiento de células tumorales y/o proliferación, reducir la migración de células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células cancerígenas o pacientes que sufren de enfermedades de cáncer son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o unc o más agentes anti-neoplásticos adicionales. En particular, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento de célula tumoral y/o proliferación, reducir la migración de células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis tumoral son para ser esperados cuando las células de melanoma o pacientes que sufren de melanoma son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agentes anti-neoplásticos adicionales, lo cual es preferentemente pero no limitado a cisplatina, dacarbazina, temozolomida/temodal, muforan/fotemustina, paclitaxel, o docetaxel. Adicionalmente, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento celular tumoral y/o proliferación, reducir la migración de la célula tumoral,

dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células de cáncer de ovario o pacientes que sufren de cáncer de ovario son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agentes anti-neoplásticos adicionales lo cual es preferentemente pero no limitado a doxorubicina, cisplatina, carboplatina, paclitaxel, docetaxel, melfalan, altretamina, topotecan, ifosfamida, etopósido, ó 5-fluorouracilo. Adicionalmente, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de célula tumoral, inhibir el crecimiento celular de tumor y/o proliferación, reducir la migración de célula tumoral, dispersión y metástasis o dañar la angiogénesis tumoral son para ser esperados cuando las células de cáncer de próstata o pacientes que sufren de cáncer de próstata son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agentes antineoplastico adicional el cual es preferentemente pero no limitado a mitozantrona, doxorubicina, paclitaxl, docetaxel, o vinblastina. Por otra parte, los efectos sinergísticos de células tumorales, para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de célula tumoral, inhibir el crecimiento de célula tumoral y/o proliferación, reducir la migración de célula tumoral, dispersión y metástasis o dañar la angiogénesis tumoral son para ser esperados cuando las células de cáncer gástrico/estomago o pacientes quienes sufren de cáncer gástrico/estómago son tratdos con anticuerpos anti-AXL antagonista en combinación con radiación y/o cualesquiera

agentes anti-neoplásticos adicionales el cual es preferentemente pero no limitado a 5-fluorouracilo, mitomicina C, cisplatina, doxorubicina, metotrexato, etopósido, leucovorina, epirubicina, paclitaxel, docetaxel, o irinotecan. También, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármaco de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento de células tumorales y/o proliferación, reducir la migración d células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células de cáncer de mama o pacientes que sufren de cáncer de mama son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agentes anti-neoplásticos el cual es preferentemente pero no limitado a doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, docetaxel, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, gemcitabina, capecitabina, vinorelbina, o trastuzumab. Adicionalmente, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia de fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento de células tunorales y/o proliferación, reducir la migración de células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células de cáncer del cuello del útero o pacientes quienes sufren de cáncer del cuello del útero son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualquier agente antineoplásico adicional el cual es preferentemente pero no limitado a cisplatina, ifosfamida, irinotecan, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, o topotecan. Por otra parte, los efectos

sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármaco de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento de células tumorales y/o proliferación, reducir la migración de células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células cancerígenas pancreáticas o pacientes que sufren de cáncer pancreático son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agente anti-neoplástico adicional el cual es preferentemente pero no limitado a gemcitabina, capecitabina, ó 5-fluorouracilo. Finalmente, pero no excluyendo otros tipos de cáncer, los efectos sinergísticos para inducir la apoptosis en y/o solucionar la resistencia a fármacos de células tumorales, suprimir la sobrevivencia de células tumorales, inhibir el crecimiento de células tumorales y/o proliferación, reducir la migración de células tumorales, dispersión y metástasis, o dañar la angiogénesis de tumor son para ser esperados cuando las células de cáncer o pacientes que sufren de cáncer de pulmón son tratados con anticuerpos anti-AXL antagonistas en combinación con radiación y/o cualesquiera agentes anti-neoplásticos adicionales el cual es preferentemente pero no limitado a cisplatina, carboplatina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinorelbina, vincristina, ifosfamida, gemcitabina, metotrexato, ciclofosfamida, lomustina o topotecan.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal caracterizado porque enlaza al dominio extracelular de AXL y por lo menos inhibe parcialmente la actividad de AXL.

2. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque reduce y/o bloquea la transducción de señal mediada por AXL.

3. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque reduce y/o bloquea la fosforilación de AXL.

4. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque reduce y/o bloquea la proliferación celular.

5. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque reduce y/o bloquea la angiogénesis.

6. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque reduce y/o bloquea la migración celular.

7. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque reduce y/o bloquea la metástasis tumoral.

8. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque reduce y/o bloquea la anti-apoptosis mediada por AXL.

9. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque reduce y/o bloquea la señalización de P13K mediada por AXL.

10. El anticuerpo monoclonal de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de los mismos.

11. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque es un anticuerpo quimérico y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 38, 39, 41, 42 o por lo menos el dominio variable de la misma, o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO.37, 40 o por lo menos el dominio variable de la misma o un aminoácido el cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

12. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 44, 46 ó por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO. 43, 45, o por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

13. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un fragmento Fv, un diacuerpo, o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.

14. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque es del tipo IgG1-, IgG2, IgG3-, ó IgG4.

15. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque es acoplado a un grupo de etiquetado.

16. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizado porque es acoplado a un grupo efector.

17. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, caracterizado porque es una proteína de andamiaje.

18. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque comprende.

una secuencia de aminoácidos de cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de:

(a) una CDRH1 como se muestra en las SEQ ID NO: 16, 22, 28, o una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO: 17, 23, 29 ó una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO: 18, 24,

30 o una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o por lo menos:

una secuencia de aminoácidos de cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo que consiste de:

(d) una CDRL1 como se muestra en las SEQ ID NO: 13, 19, 25 ó una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos del mismo,

(e) una CDRL2 como se muestra en las SEQ ID NO:14, 20, 26 ó una secuencia CDRL2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos del mismos, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO: 15, 21, 27 ó una secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos a partir del mismos,

o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

19. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque comprende una cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO:16 o una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO:17 o una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos a partir de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:18, o una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO:13 ó una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como se muestra en la SEQ ID NO:14 o una secuencia CDRL2 la cual difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO:15, o una secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

20. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17; caracterizado porque comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de:

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO: 22 ó una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO: 23, o una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:24, o una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO: 19, o una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos

de la misma,

(e) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO:20 o una secuencia CDRL2 la cual difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO: 21 o una secuencia CDRL3 en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

21. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque comprende una cadena pesada la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(a) una CDRH1 como se muestra en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia CDRH1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(b) una CDRH2 como se muestra en la SEQ ID NO: 29 o una secuencia CDRH2 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma, y

(c) una CDRH3 como se muestra en la SEQ ID NO:30, o una secuencia CDRH3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

y/o una cadena ligera la cual comprende por lo menos una CDR seleccionada del grupo el cual consiste de

(d) una CDRL1 como se muestra en la SEQ ID NO:25, o una secuencia CDRL1 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos de la misma,

(e) una CDRL2 como se muestra en la SEQ ID NO:26, o una secuencia CDRL2 la cual difiere en uno o dos aminoácidos de la misma, y

(f) una CDRL3 como se muestra en la SEQ ID NO: 27, o una

secuencia CDRL3 la cual difiere en 1 ó 2 aminoácidos del mismo o un anticuerpo monoclonal el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

22. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 8, 10, 12 o por lo menos un dominio variable de la misma o un aminoácido el cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma, y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 7, 9, 11, o por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo sobre el dominio extracelular de AXL.

23. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque se selecciona del grupo el cual consiste de:

(a) una secuencia de ácido nucleico la cual codifica un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22,

(b) una secuencia de ácido nucleico como se muestra en las SEQ ID NO: 1-6, 31-36,

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

(d) una secuencia de ácido nucleico de hibridización para (a), (b), o (c) bajo condiciones de severidad.

24. Un vector caracterizado porque comprende una

secuencia de ácido nucleicos de conformidad con la reivindicación 23.

25. El vector de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque es un vector de expresión y la secuencia de ácido nucleico está enlazada operablemente a una secuencia de control.

26. Un hospedero caracterizado porque comprende el vector de conformidad con la reivindicación 24 ó 25.

27. El hospedero de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque es un humano, bacteria, animal, hongo, anfibio o célula vegetal.

28. El hospedero de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque es un animal transgénico no humano.

29. Un proceso para fabricar un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, caracterizado porque comprende la etapa de obtener el polipéptido a partir del hospedero de la reivindicación 26, 27 ó 28.

30. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo anti-AXL, preferentemente el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23, el vector de conformidad con la reivindicación 24 ó 25, el hospedero de conformidad con la reivindicación 26, 27, ó 28 o un polipéptido generado por el proceso de conformidad con la reivindicación 29.

31. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque comprende los portadores, diluyentes y/o adyuvantes aceptables

farmacéuticamente.

32. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 30 ó 31, caracterizada porque comprende un agente activo adicional.

33. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30-32, caracterizada porque es para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

34. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30-33, caracterizada porque la enfermedad hiperproliferativa es asociada con expresión, sobreexpresión y/o hiperactividad de AXL.

35. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada porque la enfermedad hiperproliferativa es seleccionada del grupo el cual consiste de cáncer de mama, cáncer de pulmón, y otros cánceres de expresión o sobreexpresión de AXL y formación de metástasis de tumores.

36. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, caracterizado porque es para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

37. El uso de un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la fabricación de una composición farmacéutica para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

38. El uso de conformidad con la reivindicación 36, ó 37, en donde la enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad hiperproliferativa como se define de conformidad

con cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35.

39. Un método para diagnosticar una condición asociada con la expresión de AXL, caracterizado porque comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, y detectar la presencia de AXL.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque la afección es una enfermedad hiperproliferativa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35.

41. Un método para evitar o tratar una afección asociada con la expresión de AXL en un paciente, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de por lo menos el anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la condición es una enfermedad hiperproliferativa como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35.

43. El método de conformidad con la reivindicación 41 ó 42, caracterizado porque el paciente es un paciente mamífero, particularmente un paciente humano.

44. Un kit caracterizado porque comprende un anticuerpo anti-AXL, preferentemente un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, una secuencia de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23, o un vector de conformidad con la reivindicación 24 ó 25.

45. El kit de conformidad con la reivindicación 44,

caracterizado porque además comprende un agente antineoplásico adicional.

46. El uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer resistente a fármaco.

47. El uso de conformidad con la reivindicación 46, en donde el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

48. El uso de un anticuerpo anti-AXL para la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente antineoplásico para el tratamiento de una enfermedad hipreproliferativa.

49. El uso de conformidad con la reivindicación 48, en donde el anticuerpo anti-AXL es un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos monoclonales, los cuales se enlazan al dominio extracelular del receptor AXL de tirosina quinasa y los cuales inhiben por lo menos parcialmente la actividad de AXL.

Figura 1

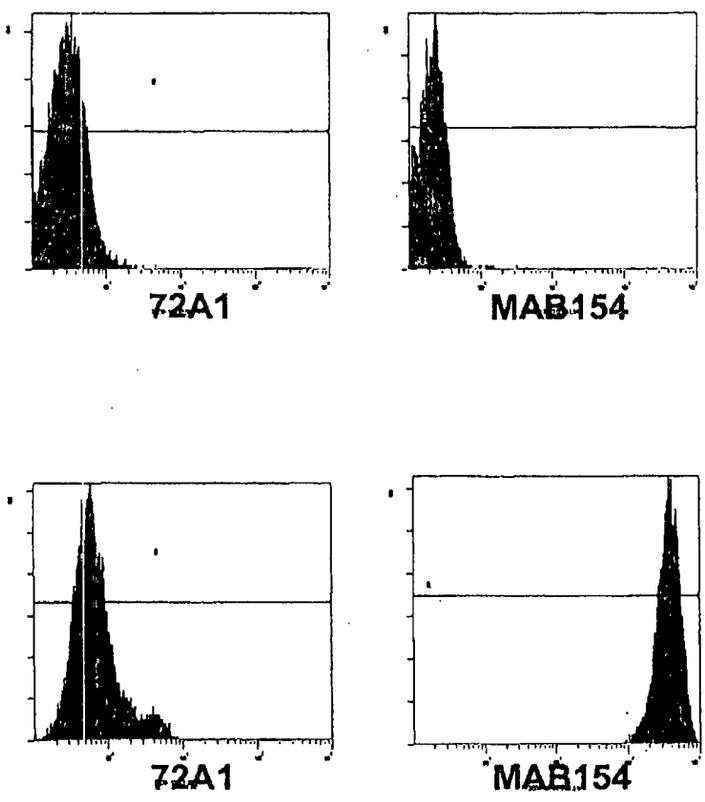


Figura 2

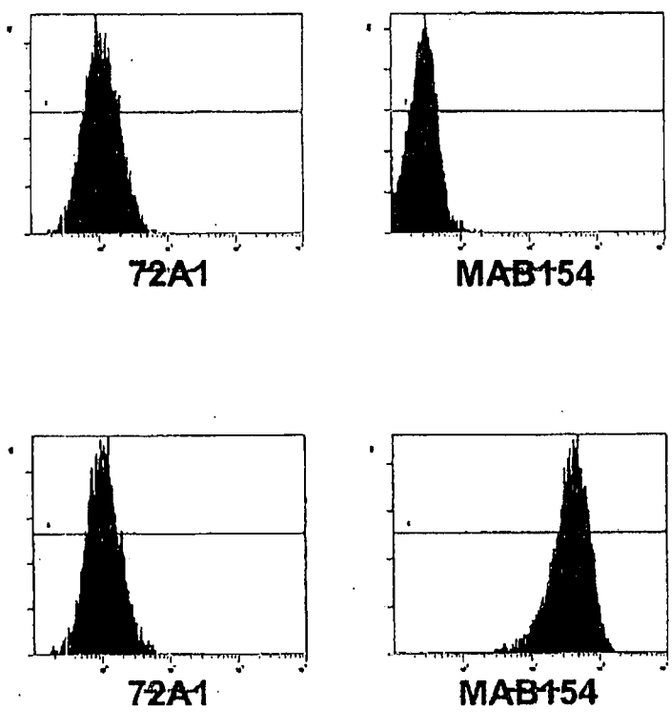


Figura 3

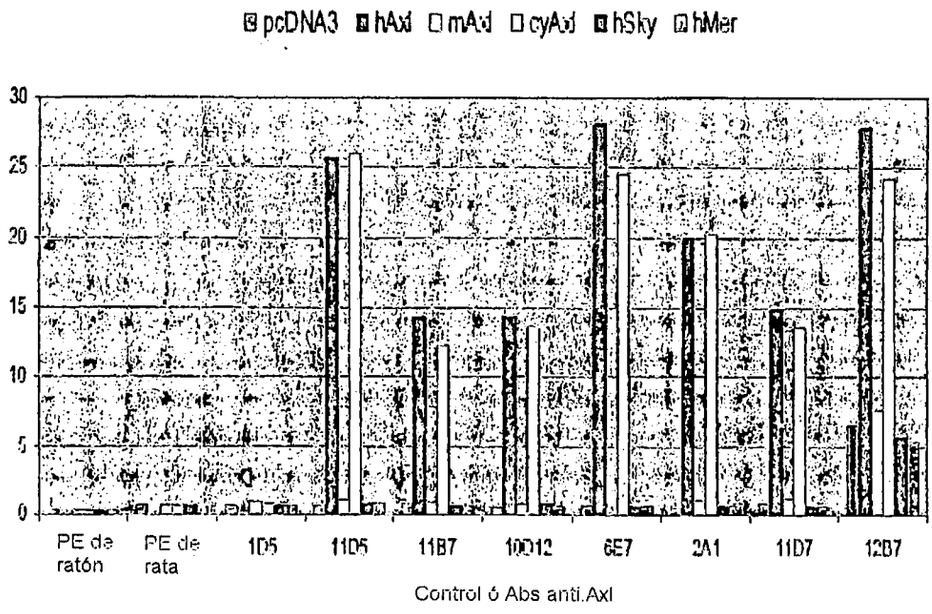

pcDNA3
hAxl
mAxl
cyAxl
hSky
hMer
30
25
20
15
10
5
0
PE de ratón
PE de rata
1D5
11D5
11B7
10D12
6E7
2A1
11D7
12B7
Control ó Abs anti.Axl

Figura 4A

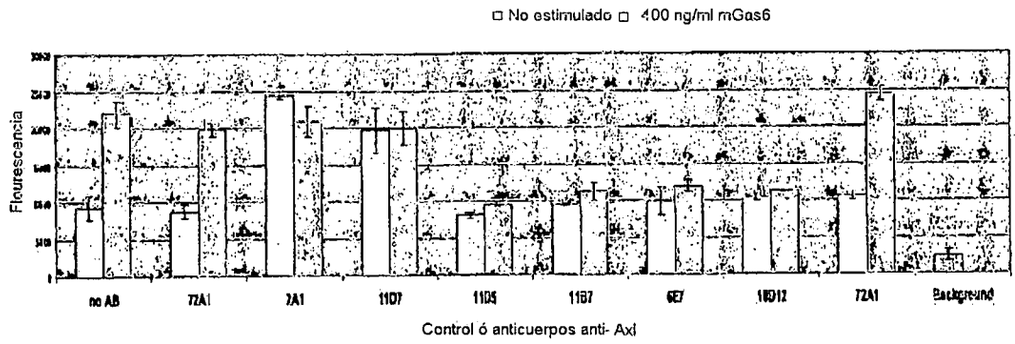


Figura 4B

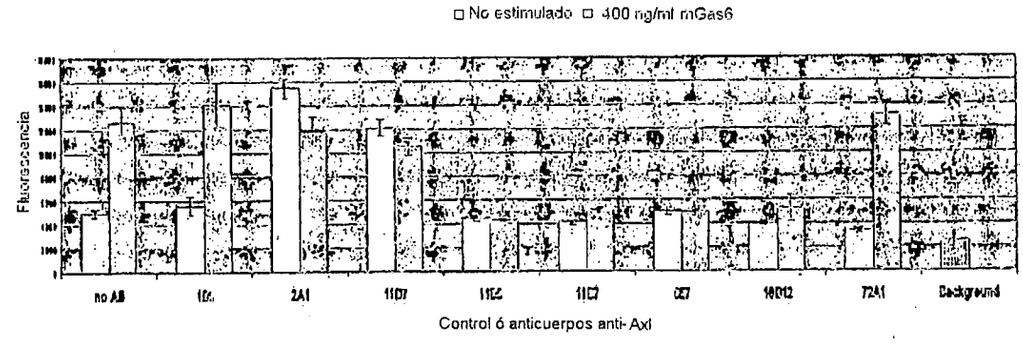


Figura 5

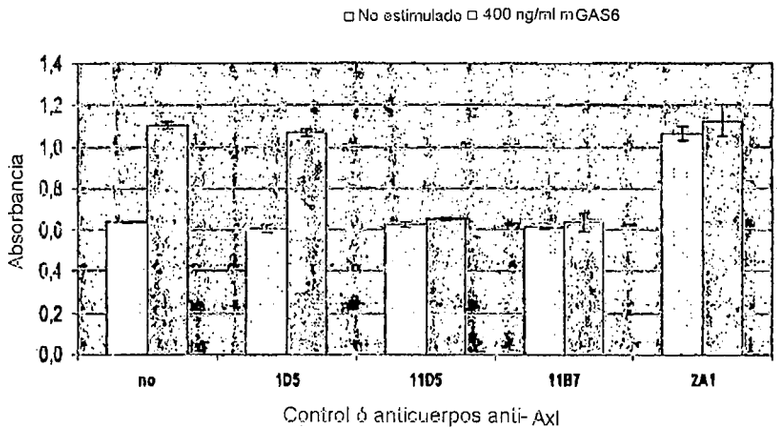

□ No estimulado □ 400 ng/ml mGAS6
Absorbancia
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
no
1D5
11D5
11B7
2A1
Control ó anticuerpos anti- Axl

Figura 6A

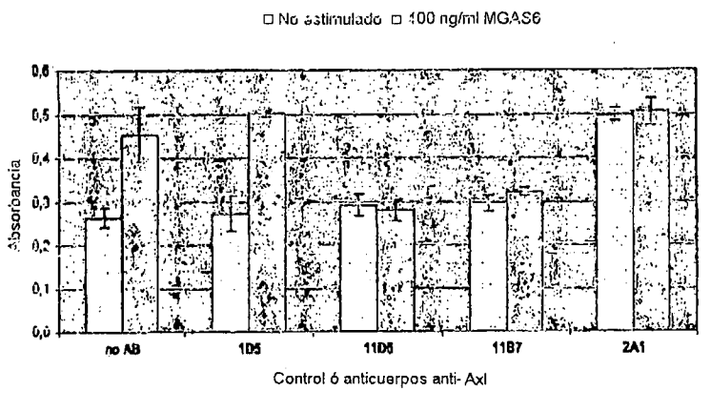


Figura 6B

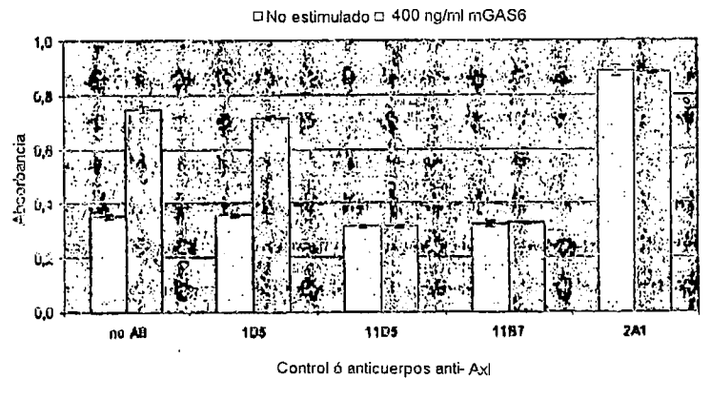
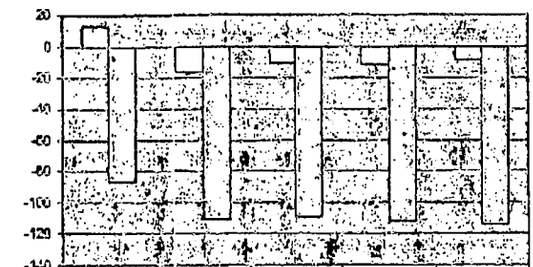


Figura 7

11B7 (rIgG2a)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml
□ *	13	-16	-11	-11	-9
□ DA56	-87	-110	-109	-112	-114

* No estimulado

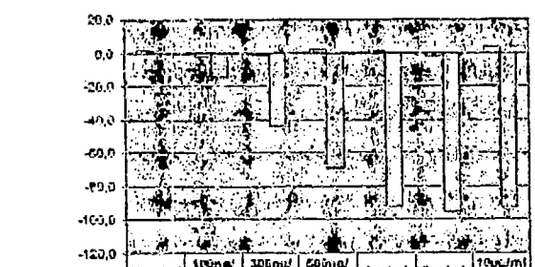
ch11B7 (hIgG2)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml
□	-3	-25	-8	-14	-7
□ GA56	-64	-105	-102	-109	-114

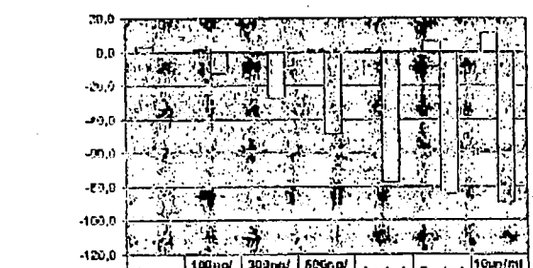
* No estimulado

11D5 (rIgG2a)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml AB
□ No estimulado	2	-2	-1	2	1	-1	3
□ 400ng/ml GA56	0	-16	-84	-89	-92	-96	-93

ch11D5 (hIgG2)



	50ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	500ng/ml	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml AB
□ No estimulado	3	1	-2	2	2	8	11
□ 400ng/ml GA56	0	-12	-27	-49	-77	-94	-89

Figura 8

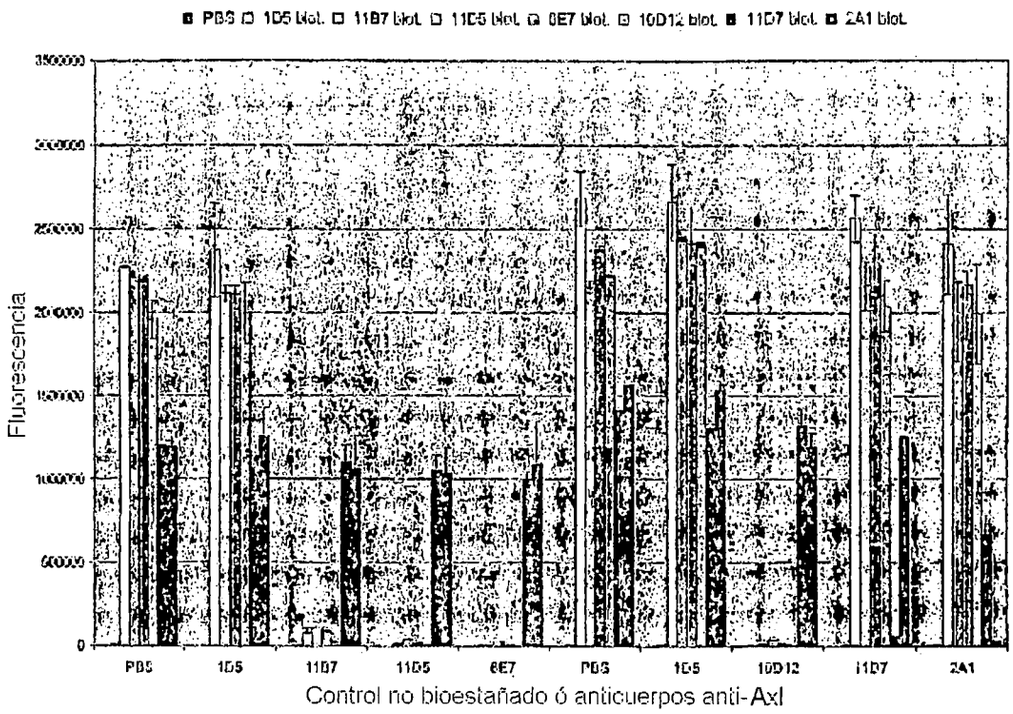

PBS 1D5 biot. 11B7 biot. 11C5 biot. 6E7 biot. 10D12 biot. 11D7 biot. 2A1 biot.
Fluorescencia
0
PBS
1D5
11B7
11C5
6E7
PBS
1D5
10D12
11D7
2A1
Control no bioestañado ó anticuerpos anti-Axl

Figura 9

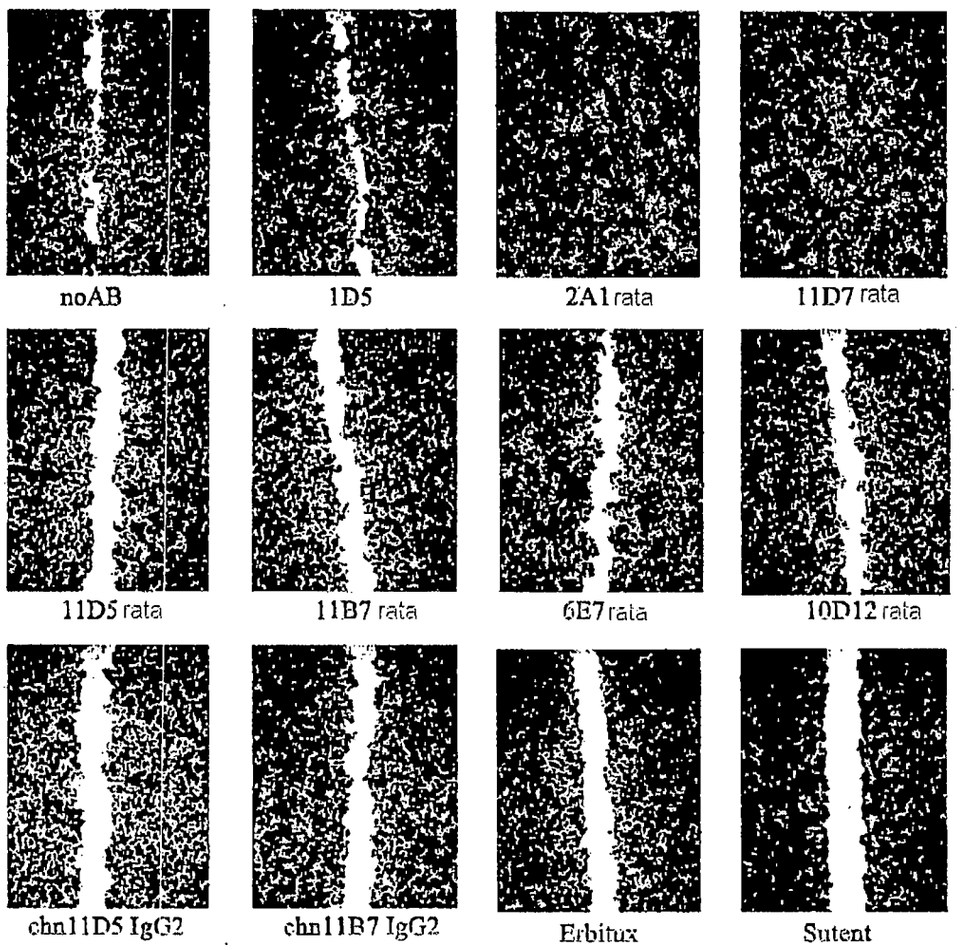

noAB
1D5
2A1 rata
11D7 rata
11D5 rata
11B7 rata
6E7 rata
10D12 rata
chn11D5 IgG2
chn11B7 IgG2
Erbitux
Sutent

Figura 10

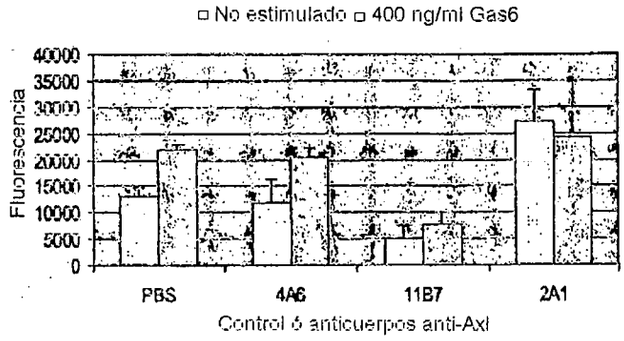

□ No estimulado □ 400 ng/ml Gas6
Fluorescencia
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
PBS
4A6
11B7
2A1
Control ó anticuerpos anti-Axl

Figura 11

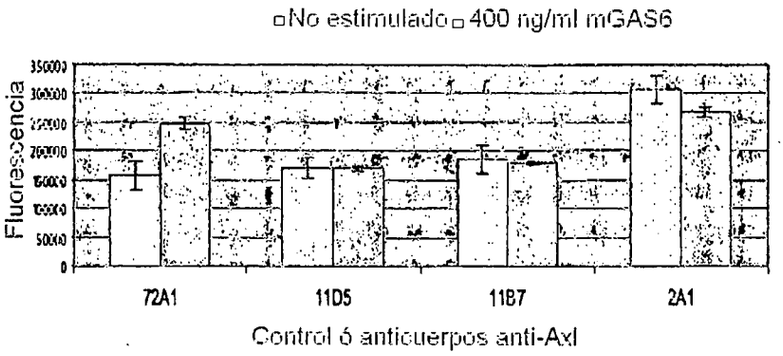

No estimulado
400 ng/ml mGAS6
Fluorescencia
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
72A1
11D5
11B7
2A1
Control ó anticuerpos anti-Axl

Figura 12

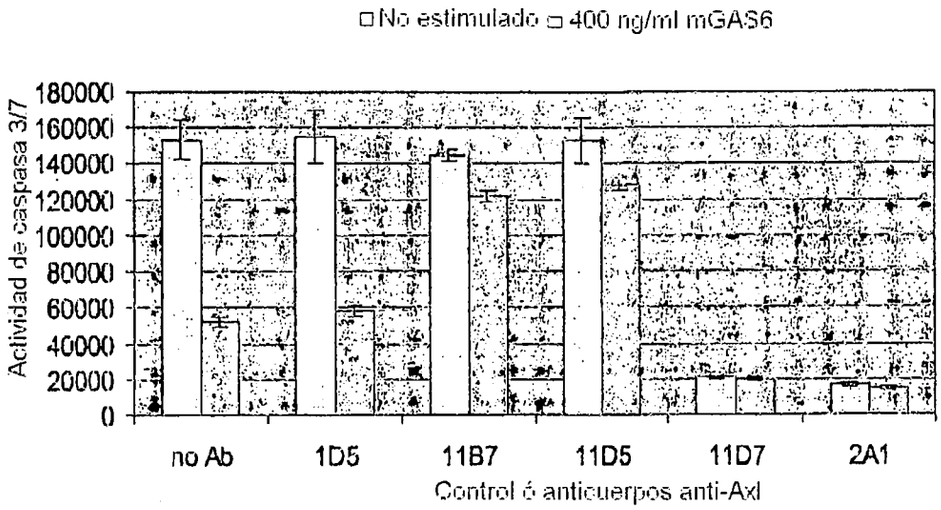

□ No estimulado □ 400 ng/ml mGAS6
Actividad de caspasa 3/7
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
no Ab
1D5
11B7
11D5
11D7
2A1
Control ó anticuerpos anti-Axl

Figura 13A

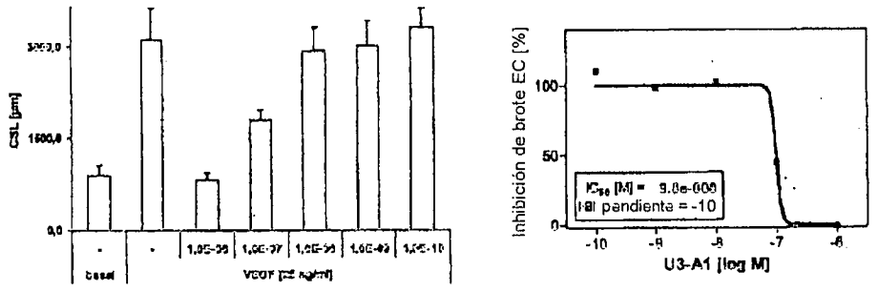


Figura 13B

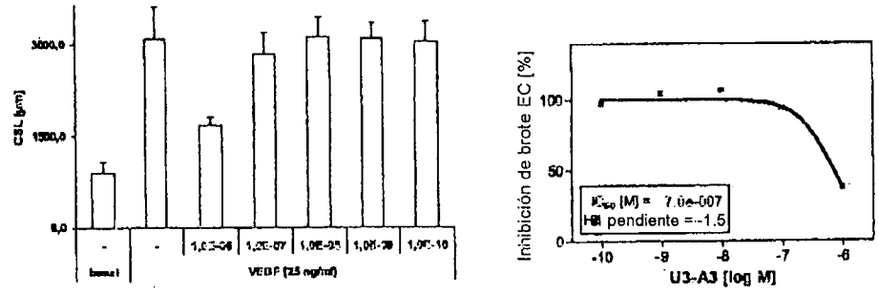


Figura 14

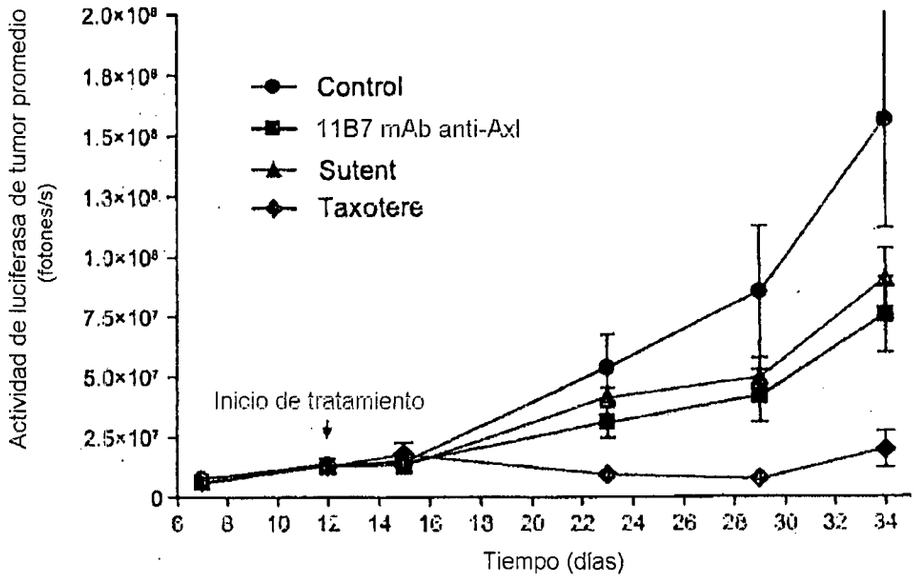

Actividad de luciferasa de tumor promedio (fotones/s)
2.0×10⁸
1.8×10⁸
1.5×10⁸
1.3×10⁸
1.0×10⁸
7.5×10⁷
5.0×10⁷
2.5×10⁷
0
Control
11B7 mAb anti-Axl
Sutent
Taxotere
Inicio de tratamiento
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
Tiempo (días)

Figura 15

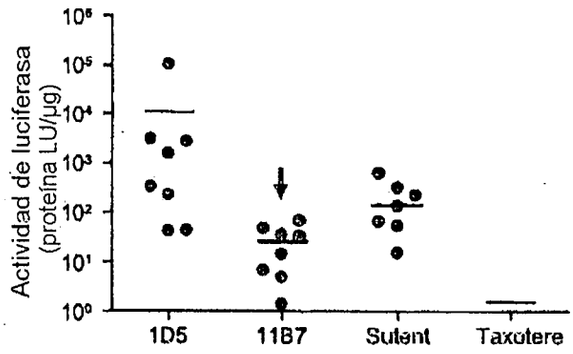
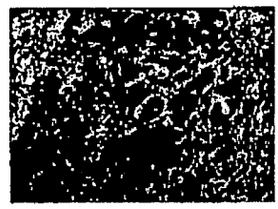

Actividad de luciferasa
(proteína LU/µg)
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
1D5
11B7
Sutent
Taxotere

Figura 16

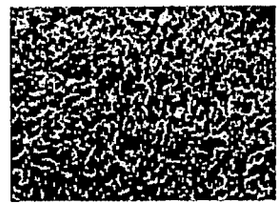
Figura A

	Intensidad ≥ 1	
	Tumor	Adyacente
Mama	3/3	0/3
Colon	3/11	0/11
Pulmón	2/9	0/9
Riñón	0/10	0/10
Linfoma fol.	0/12	0/3
Piel/Melanoma	1/13	0/12
Ovario	4/11	0/9
Próstata	0/11	0/9
Páncreas	2/9	0/11
Esófago	4/10	0/10
Barret	4/11	0/9
Estómago	6/10	0/7
Vejjiga	8/10	0/10
Cerviz	7/9	0/9
Hígado	3/9	0/7
Tiroides	5/9	0/11
Cabeza y Cuello	8/20	0/17

Figura B



Cáncer de mama



Anillo de signet gástrico
Carcicoma celular

Figura 17A

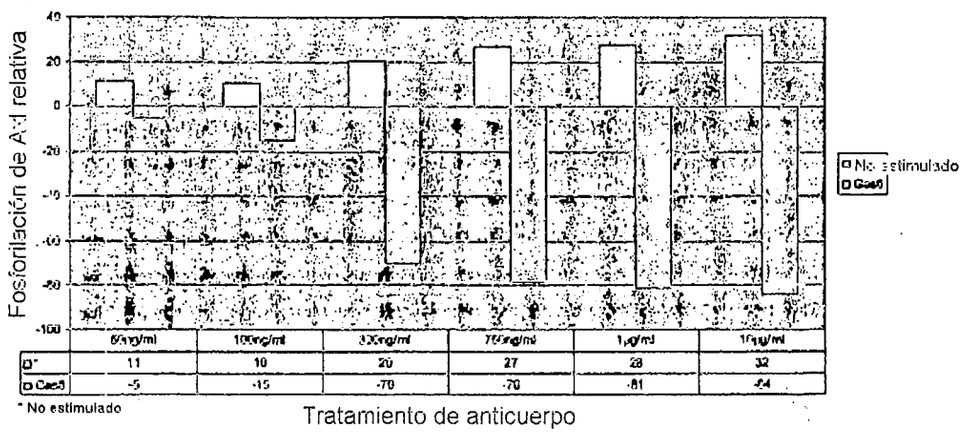


Figura 17b

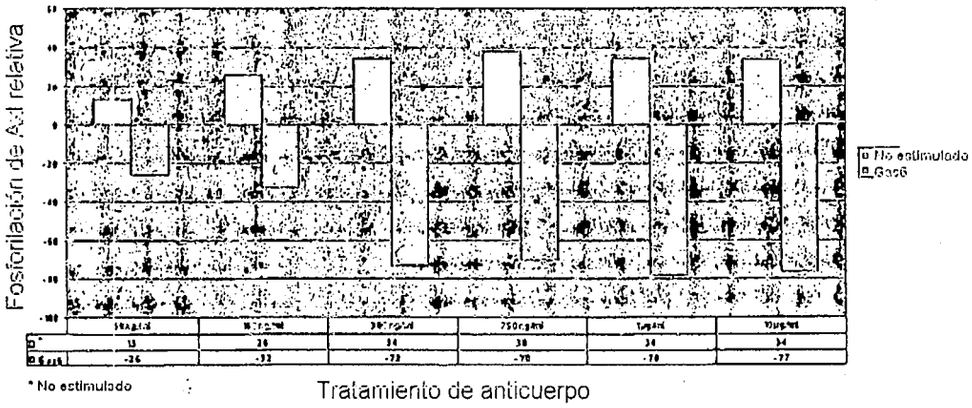
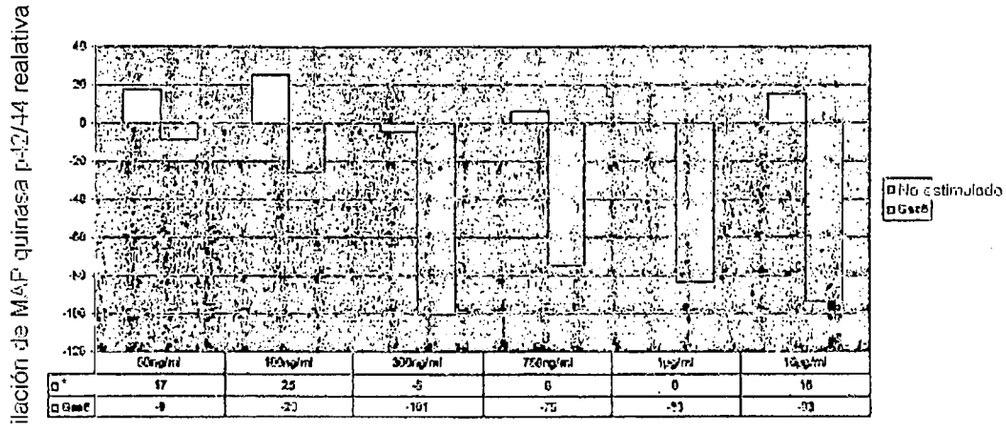


Figura 18A



	50ng/ml	150ng/ml	300ng/ml	750ng/ml	1µg/ml	10µg/ml
*	17	25	-5	8	0	16
Gas6	-9	-20	-101	-75	-93	-93

Figura 18B

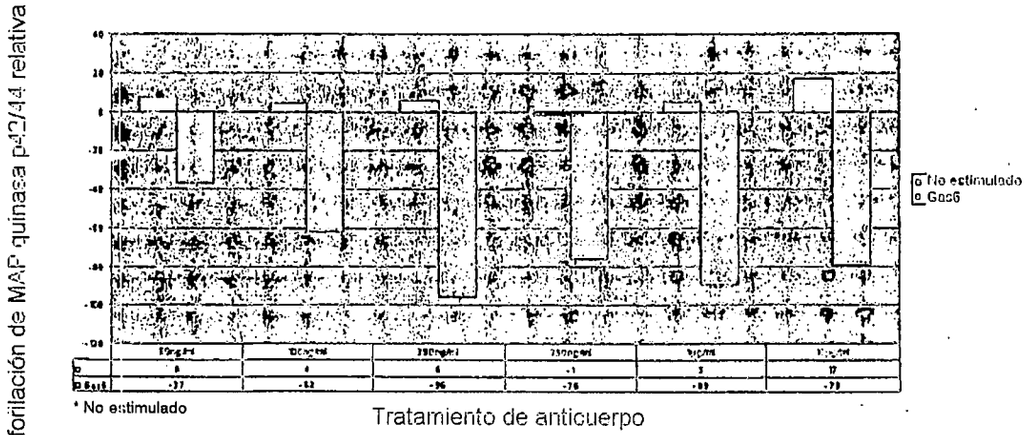


Figura 19

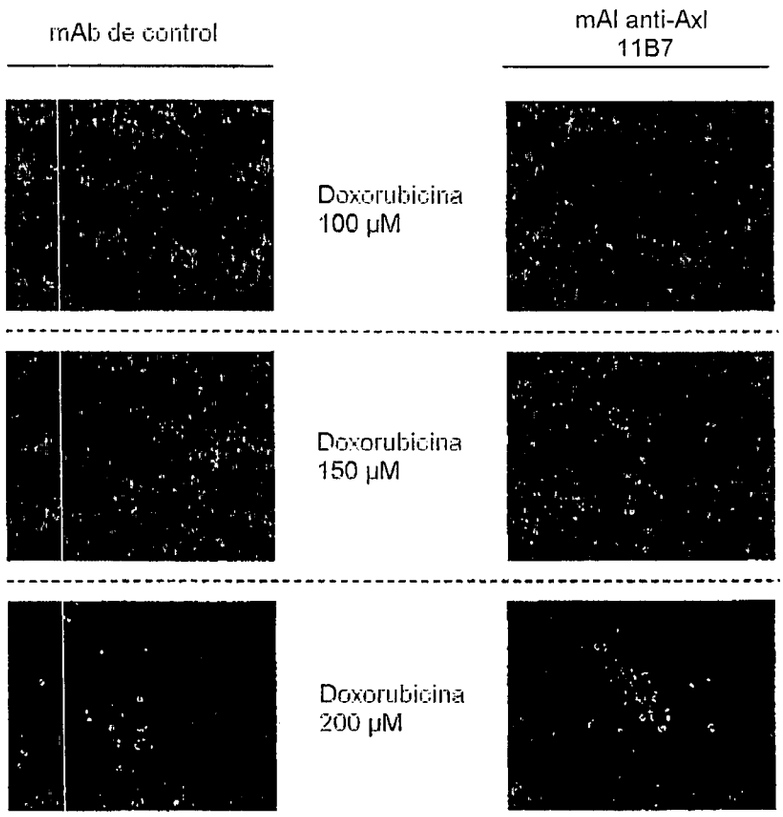
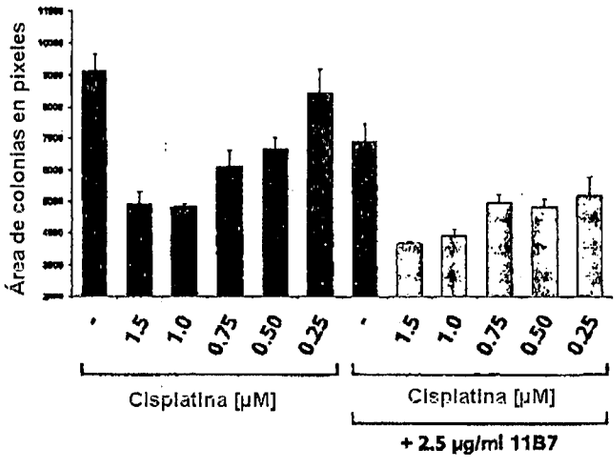
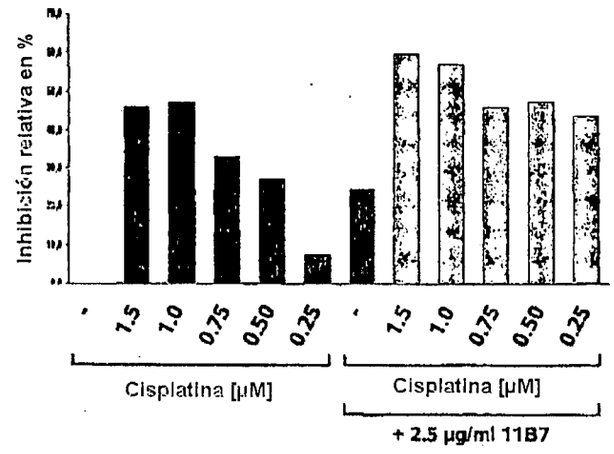

mAb de control
mAl anti-Axl
11B7
Doxorubicina
100 µM
Doxorubicina
150 µM
Doxorubicina
200 µM

Figura 20A



Área de colonias,
números absolutos

Figura 20B



Área de colonias,
números relativos

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> U3 Pharma AG

<120> ANTICUERPOS DE AXL

<130> 418C0P WO

<140> PCT/EP2008/009548

<141> 2008-11-12

<160> 84

<170> PatenIn Versión 3.3

<210> 1

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11B7-VLkappa-clone 33

<400> 1

gacatccaga tgacccaggc tccatcttcc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact 60
attacttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg 120
gggaaatctc ctaggcttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct 240
gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 2

<211> 338

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11B7-VH-clone 20

<400> 2

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac ctcacagtc actctccctc 60
actgttctgt cactggttac tccatcacta gtaattactg gggctggatc cggaagttcc 120
caggagataa aatggagtgg atgggataca taacctacag tggtagcact agctacaacc 180
catctctcaa aagtcgaatc tccattacta gagacacatc gaagaatcag ttcttcctgc 240
agttgaactc tgtaacttct gaggacacag ccacatatta ctgtgctata acaacctttt 300
attactgggg ccaaggagtc atggtcactg tctcctca 338

<210> 3

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11D5-VLkappa-clone 10

<400> 3

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc atgtctacat ctctgggaga cagagtcact 60
attacttgcc gggcaagtca agacattgga aattatttaa gctggttcca acagaaagta 120
gggaaatctc ctaggcgtat gatttatggt gcaatcaagt tggcagttgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gaagtaggtc tggatcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct 240
gaagatatgg cgatctatta ctgtctacag tatatacagt ttccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 4

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11D5-VH-clone 66

<400> 4

gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60
acctgttctg tcactggtta ttccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggaaata aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcctg 240
cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttt 300
gattactggg gccaaggagt catggtcaca gtctcgtca 339

<210> 5

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-10D12-VLkappa-clone 8

<400> 5

gacatccaga tgacccaggc tccatcttcc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact 60
attgcttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg 120
gggaaatctc ctaggcttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctcgga ccatcagcag cctggagtct 240
gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 6

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-10D12-VH-clone 5

<400> 6

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaagc cctcacagtc actctccctc 60
acctgctctg tcactggtta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggaaata aaatggagtg gatgggatac ataaccaaca gtggtggcac tgcctacaac 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg 240
caattgaact ctgtaattcc tgaggactca gccacatact tctgttcaag aacccccctgg 300
gactggggcc aaggagtcat ggtcacagtc tcctca 336

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11B7-Vlkappa-clone 33 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<400> 7

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Met Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Met Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11B7-VH-clone 20 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<400> 8

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asp Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11D15-Vlkappa-clone 10 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<440> 9

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Val Gly Lys Ser Pro Arg Arg Met Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-11D5-VH-clone 66 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<400> 10

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Ser

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-10D12-Vlkappa-clone 8 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<400> 11

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Met Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Met Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp
85 90 95

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Rat-10D12-VH-clone 5 de secuencia de aminoácidos de anticuerpo Axl

<400> 12

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Arg Thr Pro Trp Asp Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de cadena ligera de 11B7

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Arg
1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de 11B7

<400> 14

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de 11B7

<400> 15

Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de 11B7

<400> 16

Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de 11B7

<400> 17

Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de cadena pesada de 11B7

<400> 18

Thr Thr Phe Tyr Tyr
1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de cadena ligera de 11D5

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de cadena ligera de 11D5

<400> 20

Gly Ala Ile Lys Leu Ala Val
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de cadena ligera de 11D5

<400> 21

Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de cadena pesada de 11D5

<400> 22

Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de cadena pesada de 11D5

<400> 23

His Ile Thr Asn Ser Gly Asn Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 3 de cadena pesada de 11D5

<400> 24

Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 1 de cadena ligera de 10D12

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Arg
1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR 2 de cadena ligera de 10D12

<400> 26

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de 10D12

<400> 27

Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de 10D12

<400> 28

Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de 10D12

<400> 29

Tyr Ile Thr Asn Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de 10D12

<400> 30

Thr Pro Trp Asp
1

<210> 31

<211> 645

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11B7k

<400> 31

gacatccaga tgacccaggc tccatcttcc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact 60
attacttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg 120
gggaaatctc ctaggcttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tatctctga ccatcagcag cctggagtct 240
gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 32

<211> 1332

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11B7g1

<400> 32

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60
acctgttctg tcactggtta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggagata aaatggagtg gatgggatac ataacctaca gtggtagcac tagctacaac 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg 240
cagttgaact ctgtaacttc tgaggacaca gccacatatt actgtgctat aacaaccttt 300
tattactggg gccaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360
gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 420
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 480
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 660
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 720
ccaaaacccа aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 780
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840
cataatgcca agacaaagcc gcggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagt 900
cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagg caaggtctcc 960
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020

gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320
ccgggtaaat ga 1332

<210> 33

<211> 1320

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11B7g2

<400> 33

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60
acctgttctg tcactggtta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggagata aaatggagtg gatgggatac ataacctaca gtggtagcac tagctacaac 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg 240
cagttgaact ctgtaacttc tgaggacaca gccacatatt actgtgctat aacaaccttt 300
tattactggg gccaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360
gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc 420
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc 480
agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540
gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac 600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca 660
ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 720
gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac 780
gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 840
acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt 900
gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960

ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1020
tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1320

<210> 34

<211> 645

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11D5k

<400> 34

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc atgtctacat ctctgggaga cagagtcacc 60
attacttgcc gggcaagtca agacattgga aattatttaa gctggttcca acagaaagta 120
gggaaatctc ctaggcgtat gatttatggt gcaatcaagt tggcagttgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gaagtaggtc tggatcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct 240
gaagatatgg cgatctatta ctgtctacag tatatacagt ttccgctcac gttcggttct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 35

<211> 1332

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11D5g1

<400> 35

gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60
acctgttctg tcactggtta tccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggaaata aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcctg 240
cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttc 300
gattactggg gccaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360
gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 420
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 480
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540
gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 660
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 720
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 780
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 900
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320
ccgggtaaat ga 1332

<210> 36

<211> 1320

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ch11D5g2

<400> 36

gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60
acctgttctg tcactggtta ttccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120
ccaggaaata aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat 180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcctg 240
cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttt 300
gattactggg gccaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360
gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc 420
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc 480
agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540
gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac 600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca 660
ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 720
gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac 780
gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 840
acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt 900
gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg 1020
tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1320

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11B7 LC kappa

<400> 37

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Met Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 38

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11B7-HCgamma1

<400> 38

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asp Lys Met Glu Trp Met
        35                  40                  45

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

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

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

Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
        115                 120                 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
            180                 185                 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
        195                 200                 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225                 230                 235                 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
                245                 250                 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
            260                 265                 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
        275                 280                 285
```

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 39

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11B7 HC gamma2

<400> 39

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asp Lys Met Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11D5 LC kappa

<400> 40

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Val Gly Lys Ser Pro Arg Arg Met Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11D5 HC gamma1

<400> 41

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 42

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 11D5 HC gamma2

<400> 42

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

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

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

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
        115                 120                 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
            180                 185                 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
        195                 200                 205

Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
    210                 215                 220

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asn Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
```

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 43

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11B7-VLk

<400> 43

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Gly Asn Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
100 105 110

Lys Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 44

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11B7-VH

<400> 44

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 45

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11D5-VH

<400> 45

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly His Ile Thr Asn Ser Gly Asn Thr Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 46

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11D5-VLk

<400> 46

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Gly Ala Ile Lys Leu Ala Val Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Ile Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys

<210> 47

<211> 427

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11B7-VLk

<400> 47

aattaaaagc tagcaagctt gccaccatgg atatgcgtgt acctgcacag ctgttaggac 60

tgcttctgct ctggcttagg ggagcaagat gcgacatcca gatgactcag agcccaagct 120

ccttgtctgc cagtgtgggt gatagggtca ccataacctg tcgagcttca caggatatcg 180

gcaactacct acgctggtat cagcagaaac cgggcaaagc cccaaagctg ctgatctatg 240

gcgccaccaa tctggctgct ggtgttccct ctcggttcag tgggtctgga tcaggcacag 300

acttcacact caccatttcc agcctccaac ccgaggactt tgcgacgtac tactgcttgc 360

agtccaagga atccccttgg acatttgggc aagggactaa ggtggagatt aagcgtacga 420

attaaaa 427

<210> 48

<211> 429

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11B7-VH

<400> 48

aattaaggta ccaagcttgc caccatgaag cacctctggt tctttctcct gctagtggct 60
gctcctcgct gggtgttgag ccaggttcag ttgcaggaat ctggaccagg actggtcaaa 120
ccctctgaga cactgtcact gacatgcact gtgtcaggtg gctccatttc ctccaactat 180
tggggctgga ttcggcaacc tccgggaaaa gggcttgagt ggataggcta catcacctat 240
tctgggagta cctcctacaa tcccagtctt aagagcaggg tgactatcag cgtagacacc 300
tccaagaacc agtttagcct caagctgagt tctgtgactg cagcggatac agccgtctac 360
tattgtgcca gaaccacgtt ctactattgg ggtcagggca cattagtcac cgttagctca 420
gcgaattaa 429

<210> 49

<211> 427

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11D5-VLk

<400> 49

aattaaaagc tagcaagctt gccaccatgg atatgcgcgt cttagcccaa ctactcggtc 60
tgcttctgtt gtgctttcca ggagccaggt gtgacatcca gatgacacag tccctagta 120
gcctgtctgc gtctgtaggc gatcgagtga ccattacctg cagagcttcc caggatattg 180
gcaactatct gagctggttt cagcagaaac caggcaaagc acccaagagt ctcatctatg 240
gggccatcaa gctcgctgtt ggtgtgcctt cacggttttc cggatctggg tcaggcacag 300
acttcactct gaccatttcc agccttcaac cggaagactt cgcaacgtac tactgtctgc 360
agtacatcca gttccccttg actttcggtg gagggacaaa ggtggagata aagcgtacga 420
attaaaa 427

<210> 50

<211> 429

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hum11D5-VH

<400> 50

aattaaggta ccaagcttgc caccatgaag catctgtggt tcttttctgct gcttgtggct 60

gctcctaggt gggtgttaag ccaggttcag ctccaggaat ctggtcccgg attggtgaaa 120

ccgagtgaga ctctatccct gacatgcacc gttagtggag gcagtatctc tagcaactat 180

tggggctgga ttcggcaacc acctggtaag ggccttgagt ggattgggca catcaccaac 240

tctgggaata ccacctacaa tccctccctg aaatcacgcg tcacgataag cgtggacact 300

tccaagaacc agttctccct caagctctca agcgtcacag cagcggatac agccgtatac 360

tactgtgcaa gaggggcctt tgactattgg ggacagggca cattggtgac tgtcagctca 420

gcgaattaa 429

<210> 51

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador kappa_GSP1

<400> 51

gatggatgca ttggtgcagc 20

<210> 52

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador new_kappa_GSP1

<400> 52

atagatacag ttggtgcagc 20

<210> 53

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador heavy_GSP1

<400> 53

cagggtcacc atggagtta 19

<210> 54

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador xhoI-hGSP2

<400> 54

ccgctcgagc ggccgtttca gctccagctt gg 32

<210> 55

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador xhoI-hGSP2

<400> 55

ccgctcgagc gggccagtgg atagacagat gg 32

<210> 56

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador RT-gamma

<400> 56

gcgtgtagtg gttgtgcaga g 21

<210> 57

<211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador RT-gamma2

<400> 57

gggcttgccg gccgtg 16

<210> 58

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador RT-kappa

<400> 58

tggaactgag gagcaggtgg 20

<210> 59

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 5' Blp

<400> 59

agataagctt tgctcagcgt ccaccaaggg cccatcggt 39

<210> 60

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 3' Bam(GAG)

<400> 60

agatggatcc tcatttaccc ggagacaggg agag 34

<210> 61

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 5' Bsi:

<400> 61

agataagctt cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcat 39

<210> 62

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 3' Bam(CTT)

<400> 62

agatggatcc ctaacactct cccctgttga agctct 36

<210> 63

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VL-11B7-5'

<400> 63

agataagctt gtgcattccg acatccagat gacccaggct cc 42

<210> 64

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VL-11B7-3'

<400> 64

agatcgtacg tttcagctcc agcttggtgc ctc 33

<210> 65

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VL-11D5-5'

<400> 65

agataagctt gtgcattccg acatccagat gacccagtct ccatc 45

<210> 66

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VL-11D5-3'

<400> 66

agatcgtacg tttcagcttg gtcccag 27

<210> 67

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VH-11B7/11D5-5'

<400> 67

agataagctt gtgcattccg aggtgcagct tcaggagtca gg 42

<210> 68

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador VH-11B7/11D5-3'

<400> 68

agatgctgag ctgacagtga ccatgactcc ttggcc 36

<210> 69

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MOUSE1

<400> 69

gcgaattcgc caccatgggc agggtcccgc tggcctg 37

<210> 70

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MOUSE2

<400> 70

cagccgaggt ataggctgtc acagacacag tcag 34

<210> 71

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MOUSE3

<400> 71

gcaccctgtt agggtaccgg ctggcatatc 30

<210> 72

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MOUSE4

<400> 72

ataagaatgc ggccgctcag gctccgtcct cctgccctg 39

<210> 73

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador CYN01

<400> 73

aattcgccac catggcgtgg cggtgcccca g 31

<210> 74

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador CYN02

<400> 74

ctctgacctc gtgcagatgg caatcttcat c 31

<210> 75

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador CYN03

<400> 75

gtggccgctg cctgtgtcct catc 24

<210> 76

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador CYN04

<400> 76

ataagaatgc ggccgctcag gcaccatcct cctgccctg 39

<210> 77

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MER1

<400> 77

cggaattcgc caccatgggg ccggcccccgc tgcccgc 36

<210> 78

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> MER2

<400> 78

tcggctgcca ttctggccaa cttcc 25

<210> 79

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador SKY1

<400> 79

cggaattcgc caccatggcg ctgaggcgga gc 32

<210> 80

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador SKY2

<400> 80

gccctcgagc taacagctac tgtgtggcag tag 33

<210> 81

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia líder

<400> 81

atgggtgaca atgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtgcattc c 51

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia líder

<400> 82

Met Gly Asp Asn Asp Ile His Phe Ala Phe Leu Ser Thr Gly Val His
1 5 10 15

Ser

<210> 83

<211> 2682

<212> ADN

<213> Macaca fascicularis

<400> 83

atggcgtggc ggtgccccag gatgggcagg gtcccgctgg cctggtgctt ggcgctgtgc 60
ggctgggtgt gcatggcccc caggggcaca caggctgaag aaagtccttt cgtgggtaac 120
ccagggaata tcacaggtgc ccgggggactc acgggcaccc ttcggtgtca gctccaggtt 180
cagggagagc ccccccgaggt acactggctt cgggacggac agatcctgga gctcgcggac 240
agtacccaga cccaggtgcc cctgggtgaa gatgagcagg atgactggat agtggtcagc 300
cagctcagaa tcgcctccct acagctttcc gacgcgggac agtaccagtg tttggtgttt 360
ctgggacatc agaacttcgt gtcccagcct ggctacgtag ggctggaggg cttaccttac 420
ttcctggagg agcctgagga caggactgtg gccgccaaca ccccccttcaa cctgagctgc 480
caagcccagg gacccccaga gcccgtggac ctactctggc tccaggatgc tgtcccccctg 540
gccacagctc caggtcatgg tcccccagcgc aacctgcatg ttccagggct gaacaagaca 600
tcctctttct cctgcgaagc ccataacgcc aagggagtca ccacatcccg cacggccacc 660
atcacagtgc tcccccagca gcccccgtaac ctccatctgg tctcccgcca acccacggag 720
ctggaggtgg cttggactcc aggcctgagc ggcatctacc ccctgaccca ctgcaccctg 780
caggctgtgc tgtcagacga tgggatgggc atccaggcgg gagaaccaga cccccagag 840
gagcccctca ccttgcaagc atctgtgccc ccccaccagc ttcggctggg cagcctccat 900
cctcacaccc cttatcacat ccgtgtggca tgcaccagca gccagggccc ctcatcctgg 960
acacactggc ttcctgtgga gacgccggag ggagtgcccc tgggcccccc tgagaacatt 1020
agtgccacgc ggaatgggag ccaggccttc gtgcattggc aggagccccg ggcgcccctg 1080
cagggtaccc tgttagggta ccggctggcg tatcaaggcc aggacacccc agaggtgcta 1140
atggacatag ggctaaggca agaggtgacc ctggagctgc agggggacgg gtctgtgtcc 1200
aatctgacag tgtgtgtggc agcctacact gctgctgggg atggaccctg gagcctccca 1260
gtacccctgg aggcctggcg cccagggcaa gcacagccag tccaccagct ggtgaaggaa 1320
acttcagctc ctgccttctc gtggccctgg tggtatatac tgctaggagc agtcgtggcc 1380
gctgcctgtg tcctcatctt ggctctcttc cttgtccacc ggcgaaagaa ggagacccgt 1440
tatggagaag tgttcgagcc aacagtggaa agaggtgaac tggtagtcag gtaccgcgtg 1500
cgcaagtcct acagtcgccg gaccactgaa gctaccttga acagcctggg catcagtgaa 1560
gagctgaagg agaagctgcg ggatgtgatg gtggaccggc acaaggtggc cctggggaag 1620
actctgggag aaggagagtt tggagccgtg atggaaggcc agctcaacca ggacgactcc 1680
atcctcaagg tggctgtgaa gacaatgaag attgccatct gcacaaggtc agagctggag 1740
gatttcctga gtgaagcagt ctgcatgaag gaattcgacc atcccaatgt catgaggctc 1800
atcggtgtct gtttccaggg ttctgaacga gagagctttc cagcacctgt ggtcatctta 1860
cctttcatga agcatggaga cctacacagc ttcctcctct attcccggct tggggaccag 1920

ccagtgtacc tgcccactca gatgctagtg aagttcatgg cggacatcgc cagtggcatg 1980
gaatatctga gtaccaagag attcatacac cgggacctgg cggccaggaa ctgcatgctg 2040
aatgagaaca tgtccgtgtg tgtggcggac ttcgggctct ccaagaagat ctacaacggg 2100
gactactacc gccagggacg tatcgccaag atgccagtca agtggattgc cattgagagt 2160
ctagctgacc gtgtctacac gagcaagagt gatgtgtggt ccttcggggt gacaatgtgg 2220
gagattgcca caagaggcca aaccccatat ccaggcgtgg agaacagcga gatttatgac 2280
tatctgcgcc agggaaatcg cctgaagcag cctgcggact gtctggatgg actgtatgcc 2340
ttgatgtcgc ggtgctggga gctaaatccc caggaccggc caagttttac agagctgcgg 2400
gaagatttgg agaacacact gaaggccttg cctcctgccc aggagcctga cgaaatcctc 2460
tatgttaaca tggatgaagg tggaggttat cctgaacctc ccggcgctgc tggaggagct 2520
gaccccccaa cccagctaga ccctaaggat tcctgtagct gcctcacttc ggctgaggtc 2580
catctgctg gacgctatgt cctctgccct tccacagccc ctagccccgc tcagcctgct 2640

<210> 84

<211> 894

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 84

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Asn Phe Val Ser a
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu g
130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys o
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp p
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Asn Leu p
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 Leu 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

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 Thr Ser Ala Pro Ala Phe Ser Trp
435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Ile 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

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

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Leu Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ser Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/13 A61K31/704 A61K31/282
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 382 969 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 21 January 2004 (2004-01-21) paragraphs [0007] - [0010], [0014] - [0016], [0019], [0020], [0046], [0049], [0054], [0055], [0059]; claims 8-25	1-19, 22-49
X	US 5 468 634 A (LIU EDISON T [US]) 21 November 1995 (1995-11-21) column 3, line 9 - line 12 column 7, line 31 - column 8, line 4 -/--	1-14,18, 19,22, 30,31, 39,41,43

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 April 2009	27/04/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bayer, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Axl (/49M): sc-73719" 15 August 2007 (2007-08-15), SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. , XP002513577 Retrieved from the Internet: URL:http://datasheets.scbt.com/sc-73719.pdf> [retrieved on 2009-02-02] the whole document	1-19, 22-29, 36-40,44
X	HOLLAND SACHA J ET AL: "Multiple roles for the receptor tyrosine kinase Axl in tumor formation" CANCER RESEARCH, vol. 065, no. 20, October 2005 (2005-10), pages 9294-9303, XP009111560 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-19, 22-29, 36-40,44
X	WO 2006/096461 A (PHARMACIA & UPJOHN CO LLC [US]; CARROLL JAMES ALAN [US]; DAS TAPAN KAN) 14 September 2006 (2006-09-14) examples 1-3; sequence 1	23-28
X	US 2007/065444 A1 (NORTH MICHAEL A [US] ET AL) 22 March 2007 (2007-03-22)	23-28
T	examples 1-5; sequence 2	1-10, 12-19,22
X	WO 97/34636 A (IMMUNOMEDICS INC [US]; LEUNG SHUI ON [US]; LOSMAN MICHELE J [US]; HANS) 25 September 1997 (1997-09-25)	23-28
T	claims 1,2,4; figure 6; example 1	1-10, 12-19,22
X	WO 00/75333 A (NEORX CORP [US]; GOSHORN STEPHEN CHARLES [US]; GRAVES SCOTT STOLL [US]) 14 December 2000 (2000-12-14) the whole document, especially sequence 43	23-28
X	WO 2005/047327 A (BIOGEN IDEC INC [US]; FARRINGTON GRAHAM K [US]; LUGOVSKOY ALEXEY ALEXA) 26 May 2005 (2005-05-26) the whole document, especially sequence 5	23-28
X	WO 2006/104989 A (DIVERSA CORP [US]; MEDAREX INC [US]; HANSEN GENEVIEVE [US]; NESLUND GE) 5 October 2006 (2006-10-05) the whole document, especially example 1 and figure 1	23-28

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009548

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAJKOCZY PETER ET AL: "Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 11 APR 2006, vol. 103, no. 15, 11 April 2006 (2006-04-11), pages 5799-5804, XP002505666 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-10, 13-17, 23-49
T	WO 2006/131013 A (ESBATECH AG [CH]; EWERT STEFAN [CH]; BARBERIS ALCIDE [CH]; URECH DAVID) 14 December 2006 (2006-12-14) page 14, line 21 - page 15, line 7	1-10, 12-19,22
T	GB 2 404 660 A (PFIZER PROD INC [US]; ABGENIX INC [US]) 9 February 2005 (2005-02-09) sequence 23	1-10, 12-19,22
T	EP 0 378 175 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE]) 18 July 1990 (1990-07-18) figure 2	1-10, 12-19,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/009549

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-10, 19 (all complete), 11-18, 22-49 (all partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10 (all complete), 13-17, 23-49 (all partially)

A monoclonal antibody that binds to the extracellular domain of Axl and related subject-matter.

---

2. claims: 11-18, 22-49 (all partially), 19 (complete)

A monoclonal antibody that binds to the extracellular domain of Axl as recited in claim 19 and related subject-matter.

---

3. claims: 11-18, 22-49 (all partially), 20 (complete)

A monoclonal antibody that binds to the extracellular domain of Axl as recited in claim 20 and related subject-matter.

---

4. claims: 18, 23-49 (all partially), 21 (complete)

A monoclonal antibody that binds to the extracellular domain of Axl as recited in claim 21 and related subject-matter.

---

5. claim: 30 (partially)

A pharmaceutical composition comprising an anti-Axl-antibody.

---

6. claim: 44 (partially)

A kit comprising an anti-Axl-antibody.

---

7. claim: 46 (partially)

Use of and anti-Axl antibody for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of drug resistant cancer.

---

8. claim: 48 (partially)

Use of an anti-Axl antibody for the manufacture of a medicament for the co-administration with an antineoplastic agent for the treatment of a hyperproliferative disease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/009548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1382969 A	21-01-2004	AU 2003250984 A1	02-02-2004
		CA 2493111 A1	22-01-2004
		CN 1739030 A	22-02-2006
		WO 2004008147 A2	22-01-2004
		JP 2005532805 T	04-11-2005
		US 2005186571 A1	25-08-2005
US 5468634 A	21-11-1995	NONE	
WO 2006096461 A	14-09-2006	AR 053026 A1	18-04-2007
		AR 053553 A1	09-05-2007
		AR 062247 A1	29-10-2008
		AR 054233 A1	13-06-2007
		AU 2006220828 A1	14-09-2006
		AU 2006220829 A1	14-09-2006
		CA 2600434 A1	14-09-2006
		CA 2600588 A1	14-09-2006
		CA 2600608 A1	14-09-2006
		CA 2600836 A1	14-09-2006
		EP 1858552 A2	28-11-2007
		EP 1871506 A2	02-01-2008
		EP 1865986 A2	19-12-2007
		EP 1868646 A2	26-12-2007
		JP 2006249081 A	21-09-2006
		JP 2006249083 A	21-09-2006
		JP 2006249084 A	21-09-2006
		JP 2006249085 A	21-09-2006
		KR 20070100922 A	12-10-2007
		KR 20070100848 A	11-10-2007
		NZ 560844 A	29-08-2008
		US 2008248047 A1	09-10-2008
		WO 2006096488 A2	14-09-2006
		WO 2006096490 A2	14-09-2006
		WO 2006096491 A2	14-09-2006
US 2007065444 A1	22-03-2007	NONE	
WO 9734636 A	25-09-1997	AT 303161 T	15-09-2005
		AU 2342897 A	10-10-1997
		CA 2250080 A1	25-09-1997
		DE 69734109 D1	06-10-2005
		DE 69734109 T2	29-06-2006
		EP 0939653 A1	08-09-1999
		JP 2000511403 T	05-09-2000
WO 0075333 A	14-12-2000	AU 5597500 A	28-12-2000
		CA 2376192 A1	14-12-2000
		EP 1190061 A1	27-03-2002
		JP 2003501096 T	14-01-2003
WO 2005047327 A	26-05-2005	AU 2004290070 A1	26-05-2005
		CA 2545603 A1	26-05-2005
		EP 1697415 A1	06-09-2006
		JP 2008504002 T	14-02-2008
WO 2006104989 A	05-10-2006	WO 2006105062 A2	05-10-2006
WO 2006131013 A	14-12-2006	AU 2006255415 A1	14-12-2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/009548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006131013 A		CA 2609999 A1	14-12-2006
		EP 1891110 A2	27-02-2008
		JP 2008545433 T	18-12-2008
		KR 20080031003 A	07-04-2008
GB 2404660 A	09-02-2005	AR 047717 A1	15-02-2006
		BR PI0413272 A	10-10-2006
		CA 2534563 A1	24-02-2005
		EP 1660127 A1	31-05-2006
		JP 2007501013 T	25-01-2007
		NL 1026776 C2	02-08-2005
		NL 1026776 A1	07-02-2005
		PA 8608401 A1	03-03-2005
		WO 2005016382 A1	24-02-2005
		UY 28453 A1	28-02-2005
EP 0378175 A	18-07-1990	AT 123340 T	15-06-1995
		AU 629886 B2	15-10-1992
		AU 4768490 A	19-07-1990
		CA 2007336 A1	10-07-1990
		DE 3900534 A1	12-07-1990
		DE 59009163 D1	06-07-1995
		DK 0378175 T3	02-10-1995
		JP 2231567 A	13-09-1990
		JP 2787098 B2	13-08-1998
		ZA 9000136 A	31-10-1990

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2008/009548

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)*
24 March 2009 (24.03.2009)

Applicant's or agent's file reference
41800P WO/WWbj

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2008/009548

International filing date *(day/month/year)*
12 November 2008 (12.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
U3 PHARMA AG
Bunsenstrasse 1
82152 Martinsried
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
U3 PHARMA GMBH
Bunsenstrasse 1
82152 Martinsried
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Nissen Diana
e-mail PT05.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 05

PATENT COOPERATION TREATY PCT/EP2008/009548

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)*
30 March 2010 (30.03.2010)

Applicant's or agent's file reference
41800P WO/WWbj

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2008/009548

International filing date *(day/month/year)*
12 November 2008 (12.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
U3 PHARMA GMBH
Bunsenstrasse 1
82152 Martinsried
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
U3 PHARMA GMBH
Fraunhoferstr. 22
82152 Martinsried
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Authorized officer
Gaspais Stephane
e-mail pt05.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 05

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **C07K 016/028**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **U3 PHARMA GMBH**
(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** **07021931.6** (32) ***Fecha*** **12/11/2007** (33) ***País*** **EP**	(72) Inventor(es) **THORE HETTMANN Y OTROS**
	(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12/06/2010 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 12/11/2008 No. de solicitud PCT/EP2008/009548	(87) Publicación internacional Fecha: 22/05/2009 N° publicación: ***WO 2009/062690***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS DE AXL**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo monoclonal caracterizado porque enlaza al dominio extracelular de AXL y por lo menos inhibe parcialmente la actividad de AXL.

2. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque reduce y/o bloquea la transducción de señal mediada por AXL.

3. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado porque reduce y/o bloquea la fosforilación de AXL.

4. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque reduce y/o bloquea la proliferación celular.

5. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque reduce y/o bloquea la angiogénesis.

6. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque reduce y/o bloquea la migración celular.

7. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque reduce y/o bloquea la metástasis tumoral.

8. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque reduce y/o bloquea la anti-apoptosis mediada por AXL.

9. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque reduce y/o bloquea la señalización de P13K mediada por AXL.

10. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de los mismos.

11. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque es un anticuerpo quimérico y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 38, 39, 41, 42 o por lo menos el dominio variable de la misma, o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO.37, 40 o por lo menos el dominio variable de la misma o un aminoácido el cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

12. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO: 44, 46 ó por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos la cual tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo el cual consiste de SEQ ID NO. 43, 45, o por lo menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% para la misma o un anticuerpo el cual reconoce el mismo epítopo en el dominio extracelular de AXL.

13. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un fragmento Fv, un diacuerpo, o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla.

14. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque es del tipo IgG1-, IgG2, IgG3-, ó IgG4.

15. El anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque es acoplado a un grupo de etiquetado.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 32,517
FECHA : ABRIL 26 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-068105- -00000-0000
Fecha: 2010-06-04 17:20:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 364

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664722	26/04/2010	42,961,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO CAMBIDO TITULARIDAT-	350,000.00
		TOTAL : $	350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo: 17234-841-001-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-068105- -00000-0000
Fecha: 2010-06-04 17:20:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 364

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 37,624
FECHA : MAYO 10 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175527310	10/05/2010	61,440,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES	13,000.00
		TOTAL : $	13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO: 17234-841-001-7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 40,466
FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-068105- -00000-0000
Fecha: 2010-06-04 17:20:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIVII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 364

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664652	19/05/2010	27,147,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 17 a 30	1,207,000.00

****

TOTAL : $ 1,207,000.00

SON: UN MILLON DOSCIENTOS SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

CODO: 17234 - 841 - 001 - 7.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
U3 PHARMA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	10 068105
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/009548
	Fecha inicio fase nacional	12/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	436
	Oficio No.	207888

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título V de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (e)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 18 JUN. 2010
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 3, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN. Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5600070
Call Center 6513240. Linea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co