

Titolo: **Coniugati anticorpo-farmaco specifici per AXL per il trattamento del cancro**

* * * * *

DESCRIZIONE

5 CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda coniugati anticorpo-farmaco (ADC) che si legano ad AXL umano per uso terapeutico, in particolare per il trattamento di cancro resistenti o refrattari.

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

10 AXL è una proteina transmembrana da 104-140 kDa che appartiene alla sottofamiglia TAM dei recettori tirosin chinasi (RTK) e che ha capacità di trasformazione (Paccez *et al.*, 2014). Il dominio extracellulare di AXL è composto da una combinazione di due domini di tipo immunoglobulinico (Ig) N-terminali (domini Ig1 e Ig2) distali rispetto
15 alla membrana e due ripetizioni di tipo III di fibronectina (FNIII) (i domini FN1 e FN2) prossimali rispetto alla membrana (Paccez *et al.*, 2014). È stata riportata l'espressione potenziata o *de novo* di AXL in una varietà di cancro, tra cui cancro gastrico, prostatico, ovarico e polmonare (Paccez *et al.*, 2014). È da notare che si è scoperto che
20 svariati tipi di cancro con resistenza agli inibitori di tirosina chinasi, inibitori di serina/treonina chinasi e/o chemioterapia presentano proteina AXL con espressione potenziata o *de novo*. In particolare, le cellule tumorali con resistenza alla terapia di bersagliamento del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) (Wilson *et al.*,
25 2014; Brand *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012; Blakely *et al.*, 2012) o



inibitori della via B-raf (BRAF) (Müller *et al.*, 2014) hanno mostrato espressione potenziata o *de novo* di AXL. Inoltre, l'espressione potenziata o *de novo* di AXL è stata riportata in cellule di cancro della testa e del collo (SCCHN) resistenti all'inibitore di PI3K BYL719
5 (Elkabets *et al.*, 2015), in cellule di cancro mammario resistenti all'agente che bersaglia HER2 lapatinib (Liu *et al.*, 2009), in tumori stromali gastrointestinali (GIST) resistenti a imatinib (Mahadevan *et al.*, 2015), in cancro renale resistente a sunitinib (Zhou *et al.*, 2015), in cellule di neuroblastoma e cancro polmonare non a piccole cellule
10 (NSCLC) resistenti all'inibitore di ALK crizotinib (Debruyne *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013), in cancro esofageo resistente a cisplatino (Hong *et al.*, 2013), in rhabdomyosarcoma resistente all'anticorpo contro IGF-IR MAB391 (Huang *et al.*, 2010), in leucemia mieloide acuta (AML) resistente agli inibitori di FLT3 midostaurin (PKC412) o quizartinib
15 (AC220) (Park *et al.*, 2015), in AML resistente a farmaci (Hong *et al.*, 2008), e in leucemia mieloide cronica resistente a imatinib (Dufies *et al.*, 2011). L'espressione di AXL è stata anche indotta in cellule di cancro pancreatico con resistenza acquisita alla metformina (Bansal *et al.*, 2015).

20 AXL può essere attivato in seguito al legame del suo ligando, il fattore specifico per l'arresto della crescita 6 ("Growth Arrest-Specific factor", Gas6) dipendente dalla vitamina K. Il legame di Gas6 a AXL porta alla dimerizzazione di AXL, autofosforilazione e successiva attivazione di vie di segnalazione intracellulare, come le cascate di
25 PI3K/AKT, proteina chinasi attivata da mitogeno (MAPK), STAT e NF-κB



(Leconet *et al.*, 2013). Nelle cellule cancerose, l'espressione di AXL è stata associata alla motilità, invasione, migrazione delle cellule tumorali, ed è coinvolta nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (Linger *et al.*, 2010).

5 L'inibizione di AXL e/o il suo ligando Gas6 mediante bersagliamento può essere efficace come terapia antitumorale, usando ad es. piccole molecole o anticorpi anti-AXL (Linger *et al.*, 2010). Sono stati descritti anticorpi anti-AXL che attenuano la crescita di xenotrapianto di NSCLC e di cancro mammario *in vivo* mediante la
10 sottoregolazione dell'espressione del recettore, riducendo la proliferazione di cellule tumorali e inducendo apoptosi (Li *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010; WO 2011/159980, Genentech). Sono anche stati riportati vari altri anticorpi anti-AXL (Leconet *et al.*, 2013; Iida *et al.*, 2014; WO 2012/175691, INSERM; WO 2012/175692, INSERM; WO
15 2013/064685, Pierre Fabré Medicaments; WO 2013/090776, INSERM; WO 2009/063965, Chugai Pharmaceuticals e WO 2010/131733), tra cui un ADC basato su un anticorpo anti-AXL e un dimero di pirrolobenzodiazepina (PBD) (WO 2014/174111, Pierre Fabré Medicament and Spirogen Sarl).

20 Breij *et al.*, "Novel antibody-drug conjugates targeting Axl show anti-tumor activity in solid cancer xenograft models", American Association of Cancer Research, 19 April 2015, pp 1-2 (XP055296816), descrive l'uso di coniugati anticorpo-farmaco (ADC) anti-AXL per trattare cancro polmonare e carcinomi epidermoidi. Gli anticorpi anti-
25 AXL erano coniugati con MMAE.



Breij, *et al.*, Journal of Clinical Oncology, Vol. 33, 29 May, 2015, pp 1-2 (XP055297040) descrive l'uso di un anticorpo contro AXL coniugato con MMAE per uccidere cellule di cancro polmonare *in vivo*.

WO 2014/068139 descrive anticorpi anti-AXL, 1003A2 e
5 1024G11 e loro coniugati con saporina per uccidere varie linee cellulari di tumore.

WO 2016/005593 descrive anticorpi anti-AXL inibitori che inibiscono la crescita tumorale e non competono con il ligando GAS6 per il legame ad AXL, e il loro uso come ADC con MMAE per uccidere
10 vari tipi di cancro *in vivo*, come cancro mammario, cancro polmonare, carcinoma cervicale, cancro esofageo, carcinoma epidermoide e cancro pancreatico.

Tuttavia, resta la necessità di metodi migliorati per trattare cancri che sono, o che hanno una forte tendenza a diventare, resistenti
15 agli inibitori di tirosina chinasi, agli inibitori di serina/treonina chinasi e/o alla chemioterapia, in particolare usando AXL-ADC.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Il/i presente/i inventore/i ha/hanno scoperto che ADC basati su anticorpo anti-AXL possono essere usati per trattare efficacemente
20 cancri che sono resistenti, o che hanno una forte tendenza a diventare resistenti, ad alcuni agenti terapeutici.

Così, in un aspetto, l'invenzione riguarda un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano per l'uso nel trattamento di un cancro resistente ad almeno un agente terapeutico
25 selezionato dal gruppo costituito da un inibitore di tirosina chinasi, un



inibitore di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico, in cui l'ADC comprende almeno una regione di legame che comprende una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente.

Questo aspetto e forme di realizzazione e divulgazioni, incluso l'uso di AXL-ADC basati su anticorpi anti-AXL caratterizzati dalle loro proprietà di legame di antigene o sequenze, porzioni terapeutiche adatte a tali ADC, combinazioni di tali ADC con certi agenti terapeutici, e metodi per trattare neoplasmi resistenti, sono descritti più dettagliatamente di seguito.

LEGENDA DELLE FIGURE

Figura 1: Curve di legame di anticorpi anti-AXL a cellule HEK293 trasfettate con (A) AXL-ECD umano, (B) AXL-ECD di cynomolgus, o (C) AXL-ECD murino. I dati mostrati sono le intensità di fluorescenza medie ("Mean Fluorescence Intensity", MFI) di un esperimento rappresentativo, come descritto nell'Esempio 2.

Figura 2: Il legame di anticorpi anti-AXL a chimere di AXL murino-umano è stato eseguito come descritto nell'Esempio 3. Sono state testate le seguenti proteine chimeriche di AXL di *Homo sapiens* (hsAXL) e AXL di *Mus musculus* (mmAXL). (A) hsAXL e mock, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIg1, (D) hsAXL-mmIg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 3: Citotossicità mediata da cellule dipendente da

anticorpo anti-AXL in cellule A431. La citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpo da parte di anticorpi anti-AXL in cellule A431 è stata determinata come descritto nell'Esempio 4.

Figura 4: Caratteristiche di legame di coniugati anticorpo contro AXL - farmaco (AXL-ADC). Il legame di AXL-ADC su cellule HEK293T trasfettate in modo transiente con AXL umano è stato determinato come descritto nell'Esempio 5. I dati mostrati sono le intensità di fluorescenza medie (MFI) di un esperimento rappresentativo.

Figura 5: Citotossicità indotta da coniugati anticorpo contro AXL - farmaco *in vitro*. L'induzione di citotossicità da parte dei coniugati anticorpo contro AXL - farmaco è stata determinata come spiegato nell'Esempio 6.

Figura 6: Varianti di VH e VL di anticorpo che consentono il legame a AXL. Anticorpi con regioni VL o VH identiche sono stati allineati e le differenze nelle sequenze di VH (Figure A-D) o VL (Figura E), rispettivamente, sono state identificate e indicate con riquadri nelle figure. Le regioni CDR sono sottolineate.

Figura 7: L'induzione di citotossicità da parte di ADC in cellule LCLC-103H è stata determinata come descritto nell'Esempio 8.

Figura 8: Attività antitumorale da parte degli anticorpi contro AXL coniugati con MMAE in un modello di xenotrapianto di LCLC-103H terapeutico come descritto nell'Esempio 9.

Figura 9: Colorazione immunoistochimica di sezioni di tumore PAXF1657 congelate (modello PDX di cancro pancreatico) usando un



pool di anticorpi monoclonali contro AXL come descritto nell'Esempio 10.

Figura 10: (A) Dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con AXL-ADC il modello PAXF1657. Un Humab contro AXL non coniugato (C) e un ADC senza bersaglio (D) non mostrano attività antitumorale, il che indica che la capacità terapeutica di AXL-ADC era dipendente dall'attività citotossica di MMAE e dal legame con il bersaglio, le barre di errore rappresentano S.E.M.

Figura 11: Il legame di anticorpi anti-AXL a chimere di AXL murino-umano è stato eseguito come descritto nell'Esempio 11. Sono state testate le seguenti proteine chimeriche di AXL di Homo sapiens (hsAXL) e AXL di Mus musculus (mmAXL): (A) hsAXL e mock, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIg1, (D) hsAXL-mmIg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 12: Legame di Gas6 umano (hGas6) su cellule A431 che sono state pre-incubate con anticorpi che si legano al dominio Ig1 di AXL. I dati mostrati sono le intensità di fluorescenza medie (MFI) di un esperimento rappresentativo.

Figura 13: Attività antitumorale di anticorpi contro AXL coniugati con MMAE in un modello di xenotrapianto di A431 terapeutico, che produce livelli elevati di Gas6 endogena, come descritto nell'Esempio 13. I pannelli A e B mostrano risultati da 2 esperimenti indipendenti.

Figura 14: Attività antitumorale di anticorpi contro AXL coniugati con MMAE in un modello di xenotrapianto di LCLC-103H



terapeutico, che esprime bassi livelli di Gas6 endogena, come descritto nell'Esempio 13. I pannelli A e B mostrano risultati da 2 esperimenti indipendenti.

Figura 15: L'induzione di citotossicità da parte di AXL-ADC in cellule A431 (A) e in cellule MDA-MB231 (B) è stata determinata come descritto nell'Esempio 8.

Figura 16. Colorazione per AXL in cancro tiroideo, esofageo, ovarico, mammario, polmonare, pancreatico, cervicale ed endometriale. L'intensità media di colorazione per AXL (OD) di cellule positive per AXL è riportata sul grafico sull'asse x, e la percentuale di cellule tumorali positive per AXL è riportata sull'asse y. Ciascun punto rappresenta un centro ("core") di tumore, derivato da un singolo paziente.

Figura 17. Esempi rappresentativi di centri di tumore immunocolorati per AXL per diverse indicazioni di tumore.

Figura 18. Gli anticorpi contro AXL si legano specificamente a AXL ma non ad altri membri della famiglia di recettori TAM. Legame di anticorpi contro AXL HuMab a cellule HEK293 trasfettate con AXL umano (A), MER umano (B), TYRO3 umano (C) o cellule HEK293 non trasfettate (D). Per confermare la corretta espressione delle cellule trasfettate, le cellule HEK293F non trasfettate e le cellule trasfettate con AXL (E), MER (F), o TYRO3 (G) sono state colorate con anticorpi specifici per MER e TYRO3. I dati mostrati sono le intensità di fluorescenza medie (MFI) di un esperimento rappresentativo, come descritto nell'Esempio 15.

Figura 19. Rilevazione di anticorpi contro AXL sulla

membrana plasmatica di linee cellulari di tumore che sono state incubate con anticorpi contro AXL per 1 ora a 4°C, con a seguire un'incubazione per tutta la notte a 4°C o 37°C. Sia nelle cellule MDA-MB-231 (A e B) sia nelle Calu-1 (C e D) è stato rilevato più anticorpo sulla membrana plasmatica di cellule che erano state incubate a 4°C che sulle cellule che erano state incubate a 37°C, mostrando l'internalizzazione di anticorpo legato alla membrana a 37°C.

Figura 20. Media geometrica dell'intensità di fluorescenza delle cellule LCLC-103H dopo l'incubazione con anticorpi contro AXL che sono stati complessati con Fab-TAMRA/QSY7. IgG1-b12 e Fab-TAMRA/QSY7 da soli sono stati inclusi come controlli negativi.

Figura 21. (A) Dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello PDX di cancro esofageo ES0195. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. (B) Dimensione di tumore in singoli topi al giorno 32 dopo iniezione di cellule tumorali MDA-MB-231-luc D3H2LN nei cuscinetti mammari di grasso di topi SCID femmine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$

Figura 22. Effetto terapeutico di AXL-ADC in un modello di xenotrapianto di cancro cervicale derivato da paziente. (A) Dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE nel modello PDX di cancro cervicale CEXF 773. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. (B) Dimensione di tumore in singoli topi al giorno 28 dopo

l'inizio di un trattamento nel modello PDX di cancro cervicale CEXF 773. * $p < 0,001$.

Figura 23. Attività terapeutica di AXL-ADC in un modello di xenotrapianto di cancro mammario ortotopico. (A) Dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE in un modello di xenotrapianto di MDA-MB-231-luc D3H2LN ortotopico. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. (B) Dimensione di tumore in singoli topi al giorno 32 dopo iniezione di cellule tumorali MDA-MB-231-luc D3H2LN nei cuscinetti mammari di grasso di topi SCID femmine. * $p < 0,001$.

Figura 24. Citotossicità di IgG1-AXL-107-vcMMAE in linee cellulari di tumore umane con diversi livelli di espressione di AXL sulla membrana plasmatica. L'espressione di AXL nella membrana plasmatica delle linee cellulari di tumore umane è stata valutata usando analisi con Qifikit, e la citotossicità di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata espressa come percentuale di cellule di tumore vitali che sono rimaste nelle colture cellulari dopo l'esposizione a IgG1-AXL-107-vcMMAE 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 25. Efficacia antitumorale migliorata di IgG1-AXL-107-vcMMAE in un modello di xenotrapianto derivato da paziente ("Patient-Derived Xenograft", PDX) di NSCLC resistenti a erlotinib in combinazione con erlotinib. Dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib in combinazione con IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello PDX



di NSCLC LU2511. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test ANOVA a una via).

5 **Figura 26.** Espressione potenziata di proteina Axl in linee cellulari NSCLC con resistenza acquisita a EGFR-TKI. L'espressione della proteina Axl è stata determinata mediante Western Blot. La colorazione per actina è stata usata come controllo per uguale caricamento di proteina. L'espressione di Axl è stata valutata in cellule
10 che erano state coltivate in presenza (+) o in assenza (-) di erlotinib.

Figura 27. La sensibilità di cellule HCC827 e PC9 parentali (selvatiche ("wild-type")) e resistenti a erlotinib verso IgG1-AXL-107-vcMMAE (A, B, F, G, H, J, K) o EGFR-TKI (C, D, E e I) è stata valutata in saggi di vitalità. Le linee cellulari parentali (selvatiche) e resistenti a
15 erlotinib sono state esposte a concentrazioni crescenti di IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib, gefitinib o afatinib per 4 o 5 giorni dopodiché la vitalità cellulare è stata determinata come descritto nell'Esempio 22.

Figura 28. Espressione di AXL in linee cellulari di melanoma
20 stabilite e linee di melanoma primarie con basso numero di passaggi derivate da paziente (PDX). (A) Livelli variabili di espressione di AXL sono stati osservati in linee cellulari di melanoma stabilite. Espressione potenziata o *de novo* di AXL è stata osservata in linee cellulari resistenti a PLX4720 (A375-R, SKMEL28R, SKMEL147). (B) L'espressione di AXL
25 è stata osservata in 8/15 linee di melanoma primarie derivate da

paziente. Sia nelle linee cellulari di melanoma stabilite sia nelle colture PDX a basso numero di passaggi, l'espressione di AXL era inversamente correlata all'espressione di MITF.

Figura 29. Espressione della proteina AXL sulla superficie cellulare. Esempi di espressione di AXL come determinato mediante citometria a flusso quantitativa in una linea cellulare di melanoma negativa per Axl e in una positiva per Axl. I grafici grigio chiaro rappresentano la colorazione con anticorpi specifici per AXL, mentre i grafici grigio scuro rappresentano la colorazione con anticorpo di controllo di isotipo.

Figura 30. Sensibilità di linee cellulari di melanoma stabilite verso IgG1-AXL-107-vcMMAE. Le linee cellulari di melanoma (A-F; CDX) sono state trattate con IgG1-AXL-107-vcMMAE o con l'ADC di controllo di isotipo IgG1-b12-vcMMAE per 5 giorni in triplicato. La vitalità cellulare è stata valutata con un saggio CellTiter-Glo riportata su grafico in funzione di una concentrazione di ADC.

Figura 31. Sensibilità di colture cellulari di melanoma primarie verso IgG1-AXL-107-vcMMAE. Le linee cellulari di melanoma primarie con basso numero di passaggi (A-C; PDX) sono state trattate con IgG1-AXL-107-vcMMAE o con l'ADC di controllo di isotipo IgG1-b12-vcMMAE per 8 giorni in triplicato. La vitalità cellulare è stata valutata con un saggio CellTiter-Glo riportata su grafico in funzione di una concentrazione di ADC.

Figura 32. Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello di xenotrapianto derivato da paziente (PDX) di NSCLC



resistenti a erlotinib LU0858. È mostrata (A) la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib in combinazione con IgG1-AXL-107-vcMMAE. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. Sono mostrate la dimensione media di tumore e SEM di ciascun gruppo per punto temporale e la dimensione di tumore per singolo topo per gruppo al giorno 11 (B) e al giorno 21 (C). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test di Mann-Whitney).

10 **Figura 33.** Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello di xenotrapianto derivato da paziente (PDX) di NSCLC resistenti a erlotinib LU1868. È mostrata (A) la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib in combinazione con IgG1-AXL-107-vcMMAE. IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE sono stati inclusi come, rispettivamente, anticorpo di controllo di isotipo e ADC di controllo di isotipo. Sono mostrate la dimensione media di tumore e SEM di ciascun gruppo per punto temporale e la dimensione di tumore per singolo topo per gruppo al giorno 21 (B), al giorno 28 (C) e al giorno 31 (D). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test di Mann-Whitney).

20 **Figura 34.** Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello di xenotrapianto derivato da paziente (PDX) di NSCLC resistenti a erlotinib LXFA 526. (A) È mostrata la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib in combinazione con IgG1-AXL-107-vcMMAE. (B)



Dimensione media di tumore e SEM di ciascun gruppo per punto temporale e la dimensione di tumore per singolo topo per gruppo al giorno 23. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test di Mann-Whitney).

5 **Figura 35.** Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello di xenotrapianto derivato da paziente (PDX) di NSCLC LXFA 677 (A) e LXFA 677_3 (C), che ha acquisito resistenza a erlotinib. È mostrata la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, erlotinib o erlotinib in combinazione con
10 IgG1-AXL-107-vcMMAE. (B, D) Dimensione media di tumore e SEM di ciascun gruppo per punto temporale e dimensione di tumore per singolo topo per gruppo al giorno 21 del modello LXFA 677 (B) o al giorno 37 de modello LXFA 677_3 (D). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test di Mann-Whitney).

15 **Figura 36.** Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello di melanoma SKMEL147. È mostrata la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-b12, IgG1-b12--vcMMAE, IgG1-AXL-107 o IgG1-AXL-107 -vcMMAE (A). La dimensione di tumore in topi IgG1-AXL-107vcMMAE che sono stati osservati (n=2) o
20 ritrattati con IgG1-AXL-107-vcMMAE (n=4) è mostrata in B.

Figura 37. Cellule selvatiche SKMEL28 (rosso) e cellule SKMEL28-R resistenti a PLX4720 (verde) sono state miscelate 1:1 e trattate con IgG1-AXL-107-vcMMAE (AXL-ADC), IgG1-b12-MMAE (b12-ADC), PLX4720 (PLX) dabrafenib (dabr), trametinib (tram) o loro
25 combinazioni come indicato. (A) Numeri di cellule totali rispetto a cellule

non trattate. (B) Rapporto GFP/mCherry corrispondente al rapporto di cellule SKMEL28-R/SKMEL28.

Figura 38. Efficacia antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE nel modello PDX di cancro cervicale CV1664. (A) È mostrata la dimensione media di tumore dopo trattamento terapeutico con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107 o IgG1-AXL-107-vcMMAE o paclitaxel (A). (B) Sono mostrate la dimensione media di tumore e SEM di ciascun gruppo per punto temporale e la dimensione di tumore per singolo topo per gruppo al giorno 46. (C, D) È mostrata la dimensione media di tumore in topi trattati con IgG1-AXL-107-vcMMAE (C) o paclitaxel (D) che sono stati ritrattati con IgG1-AXL-107-vcMMAE. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, non significativo (test di Mann-Whitney).

Figura 39. Esempi di espressione di Axl rilevata mediante immunohistochimica in campioni di melanoma primari. (A) Esempio di melanoma con intensità di colorazione per Axl positiva +++ (B) Esempio di melanoma con intensità di colorazione per Axl positiva tra + e ++ (C) Esempio di espressione di Axl in tessuti di melanoma dallo stesso paziente prima e dopo il trattamento con vemurafenib; a sinistra = prima di vemurafenib, intensità di colorazione per Axl debolmente + ; a destra = dopo vemurafenib, intensità di colorazione per Axl da debolmente + a ++ (D) Esempio di espressione eterogenea di Axl con intensità ++ all'interno di tessuto di melanoma primario.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Applicazioni terapeutiche

L'invenzione riguarda ADC specifici per AXL (qui anche



indicati come “AXL-ADC”) come qui definiti in qualsiasi aspetto o forma di realizzazione, per l’uso nel trattamento di cancro o tumori che sono resistenti a certi chemioterapici, inibitori di tirosina chinasi (ad es. inibitori di EGFR), inibitori di serina/treonina chinasi (ad es. inibitori di
5 BRAF), come qui descritto.

La presente invenzione è basata, almeno in parte, sulla scoperta che AXL-ADC sono efficaci sia *in vitro* che *in vivo* nell’indurre citotossicità in cellule tumorali resistenti a terapia di bersagliamento di EGFR, terapia di bersagliamento di BRAF/MEK o agenti che bersagliano
10 microtuboli. Ad esempio, le cellule NSCLC con resistenza acquisita agli inibitori di EGFR erlotinib, gefitinib e afatinib hanno mostrato vitalità ridotta in seguito a trattamento con AXL-ADC (Esempio 21), e modelli resistenti a erlotinib con diverso stato del gene EGFR hanno mostrato sensibilità per AXL-ADC (Esempio 22, Tabella 17). In particolare, in più
15 modelli di tumore in cui il trattamento con l’inibitore di EGFR erlotinib non ha indotto attività antitumorale, il trattamento con AXL-ADC o una combinazione di AXL-ADC ed erlotinib ha indotto potente attività antitumorale (Esempio 22). Ad esempio, una linea cellulare resistente a erlotinib derivata da una linea cellulare sensibile a erlotinib è stata
20 particolarmente sensibile a AXL-ADC - è stata ottenuta un’attività antitumorale più forte a una dose inferiore (Esempio 22). Inoltre, linee cellulari di melanoma resistenti agli inibitori di BRAF PLX4720 (un analogo di vemurafenib) o dabrafenib hanno mostrato espressione potenziata di AXL ed erano sensibili al trattamento con AXL-ADC, e
25 AXL-ADC ha mostrato una forte attività antitumorale in un modello di



melanoma *in vivo* resistente a PLX4720 (Esempio 23). Inoltre, AXL-ADC ha indotto regressione del tumore completa o parziale in un modello di tumore di cancro cervicale in cui i tumori erano progrediti dopo il trattamento con paclitaxel (Esempio 24).

5 Quindi, la presente divulgazione fornisce un AXL-ADC, ad es. HuMax-AXL-ADC, per l'uso nel trattamento di cancro resistente ad almeno un agente terapeutico selezionato dal gruppo costituito da inibitore di tirosina chinasi, inibitore di PI3K, un anticorpo antagonista a un recettore tirosin chinasi, un inibitore di serina/treonina chinasi
10 e un agente chemioterapico. In un aspetto, l'agente terapeutico è selezionato tra un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico, in cui l'ADC comprende almeno una regione di legame che comprende una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36,
15 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente. In una particolare forma di realizzazione, l'agente terapeutico è selezionato tra un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico.

20 La presente divulgazione fornisce anche un AXL-ADC, ad es. HuMax-AXL-ADC, per l'uso nel trattamento di un cancro in combinazione con un agente terapeutico selezionato tra un agente chemioterapico, un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore di PI3K, un anticorpo antagonista a un recettore tirosin chinasi e un inibitore di
25 serina/treonina chinasi, in cui l'ADC e l'agente terapeutico sono



somministrati contemporaneamente, separatamente o sequenzialmente. Il cancro può essere resistente all'agente terapeutico e/o può avere una forte tendenza a diventare resistente all'agente terapeutico. L'agente terapeutico può in particolare essere selezionato tra un inibitore di

5 tirosina chinasi, un inibitore di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico.

Come usato qui, un cancro, tumore o simili "resistente", "resistente a trattamento" o "refrattario" significa un cancro o tumore in un soggetto, in cui il cancro o tumore non ha risposto a trattamento con

10 un agente terapeutico dall'inizio del trattamento (indicato qui come "resistenza nativa") o che ha inizialmente risposto al trattamento con l'agente terapeutico ma è diventato non più capace, o meno capace, di rispondere all'agente terapeutico dopo un certo periodo di trattamento (qui indicato come "resistenza acquisita"), portando a una malattia

15 progressiva. Per tumori solidi, anche un'iniziale stabilizzazione della malattia rappresenta una risposta iniziale. Altri indicatori di resistenza includono la ricomparsa di un cancro, l'aumento di carico tumorale, metastasi identificate recentemente o simili, nonostante il trattamento con l'agente terapeutico. Un esperto nel settore può determinare se un

20 tumore o cancro è, o ha una forte tendenza a diventare, resistente a un agente terapeutico. Ad esempio, la "National Comprehensive Cancer Network" (NCCN, www.nccn.org) e l'"European Society for Medical Oncology" (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) forniscono linee guida per determinare se uno specifico cancro risponda a trattamento. Come

25 descritto nella Tabella 1 di seguito e in altre parti di questo testo, si è



scoperto che i cancro o tumori che sviluppano resistenza a certi chemioterapici (ad es. agenti che bersagliano microtuboli (“Microtubule-Targeting Agents”, (MTA) come taxani), a inibitori di tirosina chinasi (ad es. inibitori di EGFR), ad inibitori di serina/treonina chinasi (ad es. 5 inibitori di BRAF o di MEK), a inibitori di PI3K e ad anticorpi antagonisti, esprimono AXL.

Come usato qui, il termine “soggetto” è tipicamente un essere umano al quale è somministrato l’AXL-ADC, inclusi ad esempio pazienti umani a cui è stato diagnosticato un cancro che può essere trattato 10 uccidendo le cellule che esprimono AXL, direttamente o indirettamente.

Come usato qui, un cancro che “ha una forte tendenza” alla resistenza a uno specifico agente terapeutico è un cancro che è noto per essere associato a una forte tendenza a essere o diventare resistente o refrattario a un trattamento con una certa classe di farmaci. Ad 15 esempio, un paziente affetto da cancro che sta venendo trattato o che è stato scoperto essere idoneo al trattamento con un agente terapeutico come qui descritto per il quale vi è una correlazione tra la resistenza e l’espressione potenziata o *de novo* di AXL, è affetto da un cancro che ha una forte tendenza alla resistenza. Esempi non limitativi di cancro e 20 agenti terapeutici noti per essere associati all’espressione potenziata o *de novo* di AXL e che sono pertanto possono avere una forte tendenza a diventare resistenti all’agente terapeutico, sono mostrati nella Tabella 1 di seguito. Inoltre, come mostrato nell’Esempio 24, AXL-ADC ha indotto regressione del tumore completa o parziale in un modello di tumore di 25 cancro cervicale in cui i tumori erano progrediti dopo il trattamento con



paclitaxel. In altre parti di questo testo sono anche descritti altri cancri e tipi di tumori con resistenza nativa o acquisita a un agente terapeutico e sensibili a trattamento con AXL-ADC.

Tabella 1 - Esempi di agenti terapeutici che inducono

5 *espressione potenziata o de novo di AXL*

Tipo di tumore	Composto	Bersaglio/MoA	Classe	Rif
NSCLC	Erlotinib	EGFR	TKI	Zhang (2012), Wilson (2014)
NSCLC	Crizotinib	ALK	TKI	Kim (2013)
Cancro mammario	Lapatinib	HER2, EGFR	TKI	Liu (2009)
Cancro mammario	Afatinib	EGFR	TKI	Zhang (2012)
GIST	Imatinib, sunitinib	ABL/PDGFR/cKIT	TKI	Mahadevan (2015)
Cancro renale	Sunitinib	VEGFR/PDGFR/cKIT	TKI	Zhou (2015)
Neuroblastoma	Crizotinib	ALK	TKI	Debruyne (2015)
AML	midostaurin (PKC412)	FLT3	TKI	Park (2015)
AML	Quizartinib	FLT3	TKI	Park (2015)

	(AC220)			
CML	Imatinib	ABL/PDGFR/cKI T	TKI	Dufies (2011)
SCCHN	Alpelisib (BYL719)	PI3K	PI3KI	Elkabets (2015)
SCCHN	Cetuximab	EGFR	mAb/rT KI	Brand (2015)
Rabdomio- sarcoma	MAB391	IGF-IR	mAb/rT KI	Huang (2010)
Melanoma	Vemurafenib (PLX4032) PLX4720;* Selumetinib (AZD6244);** VTX11E***	BRAF BRAF MEK ERK2	S/Th KI	Müller (2014) Konieczkowski (2014)
Cancro pancreatico	Selumetinib (AZD6244)	MEK	S/Th KI	Pettazzoni (2015)
Cancro esofageo	Cisplatino	Reticolazione di DNA	Chemio	Hong (2013)
Cancro prostatico	Metformina	Farmaco per il diabete, citostatico	Chemio	Bansal (2015)
AML	Doxorubicina, etoposide, cisplatino	Sovraregolazione pompe di resistenza	Chemio	Hong (2008)

SCCHN	Cisplatino/carbo platino	Reticolazione di DNA	Chemio	Brand (2015)
-------	-----------------------------	-------------------------	--------	-----------------

* N-(3-(5-cloro-1H-pirrolo[2,3-b]piridina-3-carbonil)-2,4-difluorofenil)propan-1-solfonammide

**6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-idrossietossi)-3-metilbenzimidazolo-5-carbossamide

5 ***4-[2-(2-Cloro-4-fluoroanilino)-5-metilpirimidin-4-il]-N-[(1S)-1-(3-clorofenil)-2-idrossietil]-1H-pirrolo-2-carbossamide

Un “inibitore di tirosina chinasi” o “TKI” come usato qui si riferisce a un composto, tipicamente un medicinale, che inibisce le tirosina chinasi o la segnalazione a valle delle tirosina chinasi. Le
 10 tirosina chinasi sono enzimi responsabili dell’aggiunta di un gruppo fosfato a una tirosina di una proteina (fosforilazione), un passaggio che i TKI inibiscono, direttamente o indirettamente. La fosforilazione di tirosina porta all’attivazione di cascate di trasduzione di segnale intracellulare. Molti TKI sono utili per la terapia per il cancro. Esempi
 15 non limitativi di tali TKI e dei loro bersagli sono mostrati nella Tabella 1 di cui sopra, e includono, ad es., inibitori di EGFR come erlotinib. In una forma di realizzazione, il termine inibitore di tirosina chinasi come usato qui si riferisce a composti che inibiscono specificamente l’attività di fosforilazione di proteina di una tirosina chinasi, ad es., l’attività di
 20 tirosina chinasi dell’EGFR.

Sebbene molti TKI nell’uso clinico siano medicinali a molecola piccola, vi sono anche “inibitori di recettore tirosin chinasi” (rTKI) come anticorpi antagonisti che si legano alla frazione extracellulare di

un recettore tirosin chinasi (qui indicata come “mAb/rTKI”), inibendo in tal modo la segnalazione mediata da recettore. Esempi di tali anticorpi sono cetuximab e MAB391.

Un “inibitore di fosfoinositide 3-chinasi” o “PI3KI” come usato
5 qui si riferisce a un composto, tipicamente un medicinale, che inibisce un enzima nella via PI3K/AKT. Esempi di PI3KI includono Alpelisib (BYL791).

Un “inibitore di serina/treonina chinasi” o “S/Th KI” (“serine/threonine kinase inhibitor”), come usato qui, si riferisce a un
10 composto, tipicamente un medicinale, che inibisce le serina/treonina chinasi come BRAF o MEK o le vie di segnalazione a valle da tali serina/treonina chinasi come attraverso le vie BRAF/MEK. Le serina/treonina chinasi sono enzimi responsabili della fosforilazione del gruppo idrossilico di un residuo di serina o di treonina, un passaggio
15 che i S/Th KI inibiscono, direttamente o indirettamente. La fosforilazione di serine o tirosine porta all’attivazione di cascate di trasduzione di segnale intracellulare. Esempi di S/Th KI utili per la terapia per il cancro, e di loro bersagli, sono mostrati nella Tabella 1 di cui sopra, e includono inibitori di BRAF come vemurafenib e loro
20 analoghi o derivati. In una forma di realizzazione, il termine inibitore di serina/treonina chinasi come usato qui si riferisce a composti che inibiscono specificamente l’attività di fosforilazione di proteina di una serina/treonina chinasi, ad es., l’attività di serina/treonina chinasi di una BRAF o MEK mutante.

25 Il vemurafenib (PLX4032) è un inibitore a molecola piccola,



competitivo con l'ATP, biodisponibile per via orale, di chinasi BRAF mutata, che si lega selettivamente a e inibisce BRAF che comprende certe mutazioni, il che porta a un'inibizione di una via di segnalazione di MAPK sovra-attivata a valle nelle cellule tumorali che esprimono la
5 chinasi BRAF mutante. Le mutazioni di BRAF identificate in cancro umano sono generalmente collocate nell'ansa P ricca di glicina del lobo N e nel segmento di attivazione e nelle regioni fiancheggianti all'interno del dominio di chinasi. Il vemurafenib si lega a e inibisce chinasi BRAF che ha certe di queste mutazioni, come, ma non limitate a, una
10 sostituzione di amminoacido nel residuo V600 (ad es. V600E), nel residuo L597 (ad es. L597R; Bahadoran *et al.*, 2013) e nel residuo K601 (Dahlman *et al.*, 2012).

Come usato qui, un "derivato" di un farmaco è un composto che è derivato o derivabile, mediante una reazione chimica diretta, dal
15 farmaco. Come usato qui, un "analogo" o "analogo strutturale" di un farmaco è un composto che ha struttura e/o meccanismo di azione simile/i al farmaco ma che differisce in almeno un elemento strutturale. Analoghi o derivati "terapeuticamente attivi" di un farmaco come, ad es., vemurafenib o erlotinib, hanno un'efficacia terapeutica simile o
20 migliorata in confronto al farmaco ma possono essere diversi in, ad es., una o più tra stabilità, specificità per il bersaglio, solubilità, tossicità e simili.

Le Tabelle 2 e 3 di seguito mostrano inibitori di BRAF e di EGFR che hanno un meccanismo di azione (inibizione di BRAF o di
25 EGFR, rispettivamente) simile rispettivamente a vemurafenib ed



erlotinib.

Tabella 2 - Inibitori di BRAF

Nome dell'inibitore	
Vemurafenib (PLX4032) (PLX4720= composto sonda ("tool compound"))	Bollag (2012)
GDC-0879 *	Wong (2009)
Dabrafenib (GSK2118436)	Hong (2012)
Encorafenib (LGX818)	Li (2016)
Sorafenib (BAY 43-9006)	Hilger (2002)
RAF265 (CHIR-265)	Mordant (2010)
SB590885 **	King (2006)
AZ628 ***	Montagut (2008)

*(E)-5-(1-(2-idrossietil)-3-(piridin-4-il)-1H-pirazol-4-il)-2,3-diidroinden-1-one ossima

5 ** (E)-5-(2-(4-(2-(dimetilammino)etossi)fenil)-4-(piridin-4-il)-1H-imidazol-5-il)-2,3-diidroinden-1-one ossima

***3-(2-cianopropan-2-il)-N-(4-metil-3-(3-metil-4-oxo-3,4-diidrochinazolin-6-ilamino)fenil)benzammide

Tabella 3 - Inibitori di EGFR

Nome	Classe	
Erlotinib	TKI	Pollack (1999)
Gefitinib	TKI	Sirotnak (2000)

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

Di conseguenza, come mostrato qui, la resistenza del melanoma a vemurafenib, dabrafenib, trametinib o combinazioni di due o più di essi; e la resistenza di NSCLC a erlotinib, gefitinib o afatinib, o combinazioni di due o più di essi, possono essere associate all'espressione *de novo* o potenziata di AXL da parte delle cellule tumorali. Pertanto, tali tumori possono essere idonei al trattamento con un ADC specifico per AXL.

La presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un cancro in un soggetto, in cui il cancro è resistente ad almeno un agente terapeutico selezionato tra un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore

di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico, il metodo comprendendo la somministrazione di un AXL-ADC. Il cancro può ad esempio avere acquisito la resistenza durante un trattamento precedente o ancora in corso con l'agente terapeutico. In alternativa, il
5 cancro era resistente dall'inizio del trattamento con l'agente terapeutico. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL. L'agente terapeutico può essere un inibitore di PI3K o un mAb/rTKI.

La presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un cancro in un soggetto, il metodo comprendendo la somministrazione di
10 un AXL-ADC in combinazione con almeno un agente terapeutico selezionato tra un agente chemioterapico, un inibitore di tirosina chinasi o un inibitore di serina/treonina chinasi, in cui l'ADC e l'agente terapeutico sono somministrati contemporaneamente, separatamente o sequenzialmente. Il cancro può avere una forte tendenza alla resistenza
15 all'agente terapeutico. Il cancro può essere resistente all'agente terapeutico. L'agente terapeutico può essere un inibitore di PI3K o un mAb/rTKI.

Come mostrato dagli inventori della presente invenzione e nella Tabella 1 di cui sopra, in certi tipi di cancro lo sviluppo di
20 resistenza è stato associato a espressione aumentata o *de novo* di AXL. Tali cancri possono includere, ma non sono limitati a, melanoma, cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC), cancro cervicale, cancro ovarico, carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (SCCHN), cancro mammario, tumori stromali gastrointestinali (GIST),
25 cancro renale, neuroblastoma, cancro esofageo, rabdomiosarcoma,



leucemia mieloide acuta (AML), una leucemia mieloide cronica (CML).

Il cancro o tumore può essere selezionato tra cancro cervicale, melanoma, NSCLC, SCCHN, cancro mammario, GIST, cancro renale, neuroblastoma, cancro esofageo e rabdomiosarcoma. In un'altra forma
5 di realizzazione, il cancro è un cancro ematologico selezionato tra AML e CML.

Il cancro o tumore può essere caratterizzato da almeno una mutazione nella sequenza amminoacidica di EGFR selezionata tra L858R e T790M, come ad es. L858R o T790M/L858R. Ad esempio, il
10 cancro o tumore può essere un NSCLC.

L'almeno un agente terapeutico può essere costituito da o può comprendere un inibitore TKI che è un antagonista di EGFR, un antagonista di HER2, un inibitore di ALK, un inibitore di FLT3 o una combinazione di due o più degli stessi. TKI preferiti, senza limitazione,
15 includono erlotinib, gefitinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib, imatinib, sunitinib, afatinib, crizotinib, midostaurin (PKC412) e quizartinib (AC220). In una forma di realizzazione, il TKI è un inibitore di EGFR, come erlotinib o un suo analogo o derivato terapeuticamente attivo, ad es. afatinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib o gefitinib.

20 L'inibitore di tirosina chinasi può essere erlotinib e il cancro può essere un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a erlotinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere erlotinib e il cancro può essere un cancro pancreatico, resistente a o avente una forte
25 tendenza a diventare resistente a erlotinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere gefitinib e il cancro può essere un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a gefitinib.

5 L'inibitore di tirosina chinasi può essere crizotinib e il cancro può essere un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a crizotinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere lapatinib e il cancro può essere un cancro mammario, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a lapatinib.

10 L'inibitore di tirosina chinasi può essere imatinib e il cancro è un CML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a imatinib.

15 L'inibitore di tirosina chinasi può essere imatinib e il cancro può essere un GIST, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a imatinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere sunitinib e il cancro può essere un GIST, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a sunitinib.

20 L'inibitore di tirosina chinasi può essere sunitinib e il cancro può essere un cancro renale, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a sunitinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere crizotinib e il cancro può essere un neuroblastoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a crizotinib.

25 L'inibitore di tirosina chinasi può essere midostaurin



(PKC412) e il cancro può essere AML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a midostaurin.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere quizartinib e il cancro può essere una AML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a quizartinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere afatinib e il cancro può essere un cancro mammario, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente ad afatinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere axitinib e il cancro può essere un cancro renale, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente ad axitinib.

L'inibitore di tirosina chinasi può essere lenvatinib e il cancro può essere un cancro tiroideo, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a lenvatinib.

La presente divulgazione riflette sul fatto che l'inibitore di tirosina chinasi è un agente di inibizione di EGFR, come, ad es., erlotinib o un suo analogo o derivato terapeuticamente attivo, preferibilmente in cui il cancro è un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente all'agente di inibizione di EGFR. Nello specifico, il cancro o tumore (ad es. NSCLC) può essere caratterizzato da almeno una mutazione nel EGFR selezionata tra L858R e T790M, o una loro combinazione.

L'almeno un agente terapeutico può essere costituito da o comprendere un inibitore di PI3K. Inibitori di PI3K preferiti, senza limitazione, includono alpelisib e suoi analoghi e derivati



terapeuticamente attivi.

Il PI3Ki può essere alpelisib (BYL719) e il cancro può essere un SCCHN, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente ad alpelisib.

5 L'almeno un agente terapeutico può essere costituito da o comprendere un anticorpo agonista che si lega alla frazione extracellulare di un recettore tirosin chinasi. mAb/rTKI preferiti, senza limitazione, includono cetuximab e l'anti-IGF-IR MAB391 così come analoghi e derivati terapeuticamente attivi di cetuximab e di
10 MAB391.

Il mAb/rTKI può essere cetuximab e il cancro può essere un SCCHN, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a cetuximab.

Il mAb/rTKI può essere l'anticorpo anti-IGF-IR MAB391 e il
15 cancro può essere un SCCHN, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a MAB391.

L'almeno un agente terapeutico può essere costituito da o comprendere un S/Th KI che è un inibitore di BRAF, un inibitore di MEK o una loro combinazione. Il S/Th KI può essere un inibitore di
20 BRAF, come vemurafenib (PLX4032) o un suo derivato o analogo terapeuticamente efficace, ad es., PLX4720 o dabrafenib; o VTXKIIE. Il S/Th KI può essere un inibitore di MEK, come selumetinib (AZD6244) o trametinib.

Il S/Th KI può essere vemurafenib e il cancro può essere un
25 melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare



resistente a vemurafenib.

Il S/Th KI è vemurafenib e il cancro può essere un cancro coloretale, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a vemurafenib.

5 Il S/Th KI può essere dabrafenib e il cancro può essere un melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a dabrafenib.

10 Il S/Th KI può essere dabrafenib e il cancro può essere un cancro coloretale, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a dabrafenib.

Il S/Th KI può essere selumetinib e il cancro può essere un cancro pancreatico, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a selumetinib.

15 Il S/Th KI può essere selumetinib e il cancro può essere un melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a selumetinib.

L'inibitore S/Th KI può essere trametinib e il tumore può essere un melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a trametinib.

20 Il S/Th KI può essere VTXKIIE e il cancro può essere un melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a VTXKIIE.

25 Il S/Th KI può essere PLX4720 e il cancro può essere un melanoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a PLX4720.



L'almeno un agente terapeutico può essere costituito da o comprendere un inibitore di BRAF. In una forma di realizzazione particolare, l'inibitore di BRAF è vemurafenib (PLX4032) o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace, come dabrafenib o
5 PLX4720. L'inibitore di BRAF può essere vemurafenib o un suo derivato o analogo terapeuticamente efficace, e il tumore può essere un melanoma resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a vemurafenib. Vemurafenib può essere un inibitore della chinasi BRAF che ospita certe mutazioni, come mutazioni collocate
10 nell'ansa P ricca di glicina del lobo N e nel segmento di attivazione e nelle regioni fiancheggianti all'interno del dominio di chinasi. L'analogo di vemurafenib può essere dabrafenib.

L'AXL-ADC fornito dalla presente divulgazione può in particolare essere per l'uso nel trattamento di un melanoma che
15 esprime AXL resistente a un agente terapeutico con il quale il melanoma sta venendo trattato o è stato trattato, in cui l'agente terapeutico è vemurafenib o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace, e in cui il melanoma esibisce una mutazione in BRAF. In particolare, il melanoma può presentare una mutazione in
20 BRAF che rende BRAF sensibile all'inibizione da parte di vemurafenib o del suo analogo o derivato terapeuticamente efficace. Mutazioni non limitative includono sostituzioni, delezioni o inserimenti di amminoacido/i; preferibilmente, la mutazione è una sostituzione di amminoacido/i. Residui specifici per tali mutazioni includono, ma non
25 sono limitati a, V600 (ad es. V600E, V600K e V600D), residuo L597 (ad



es. L597R) e residuo K601 (K601E). In una forma di realizzazione, la mutazione è selezionata tra V600E, V600D, V600K, L597R e K601E.

In una forma di realizzazione, l'almeno un agente terapeutico è costituito da o comprende un agente chemioterapico selezionato dal
5 gruppo costituito da paclitaxel, docetaxel, cisplatino, doxorubicina, etoposide, carboplatino e metformina o una loro combinazione. L'agente terapeutico può essere un agente che bersaglia microtuboli, come, ad es., paclitaxel, docetaxel o vincristina, o un analogo o derivato terapeuticamente attivo di qualsiasi di essi. L'almeno un agente
10 terapeutico può essere un taxano, come paclitaxel, docetaxel o un analogo o derivato terapeuticamente attivo di paclitaxel o docetaxel.

L'agente chemioterapico può essere paclitaxel, e il cancro può essere cancro cervicale, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a paclitaxel.

15 L'agente chemioterapico può essere paclitaxel, e il cancro può essere un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a paclitaxel.

L'agente chemioterapico può essere paclitaxel, e il cancro può essere un cancro ovarico, resistente a o avente una forte tendenza a
20 diventare resistente a paclitaxel.

Il chemioterapico può essere docetaxel e il cancro può essere un cancro alla testa e al collo, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a docetaxel.

25 Il chemioterapico può essere docetaxel e il cancro può essere un cancro gastrico, resistente a o avente una forte tendenza a diventare



resistente a docetaxel.

Il chemioterapico può essere docetaxel e il cancro è un cancro mammario, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a docetaxel.

5 Il chemioterapico può essere docetaxel e il cancro può essere un cancro prostatico, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a docetaxel.

10 Il chemioterapico può essere docetaxel e il cancro può essere un NSCLC, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a docetaxel.

L'agente chemioterapico può essere cisplatino, e il cancro può essere un cancro esofageo, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a cisplatino.

15 L'agente chemioterapico può essere cisplatino, e il cancro può essere un SCCHN, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a cisplatino.

L'agente chemioterapico può essere carboplatino, e il cancro può essere un SCCHN, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a carboplatino.

20 L'agente chemioterapico può essere cisplatino, e il cancro può essere una AML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a cisplatino.

25 L'agente chemioterapico può essere doxorubicina, e il cancro può essere una AML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a doxorubicina.



L'agente chemioterapico può essere etoposide, e il cancro può essere una AML, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a etoposide.

5 L'agente chemioterapico può essere metformina, e il cancro può essere un cancro prostatico, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a metformina.

L'agente chemioterapico può essere cisplatino, e il cancro può essere un cancro ovarico, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a cisplatino.

10 L'agente chemioterapico può essere doxorubicina, e il cancro può essere un cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC), resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a doxorubicina.

15 L'agente chemioterapico può essere temozolomide, e il cancro può essere un astrocitoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a temozolomide.

L'agente chemioterapico può essere carboplatino, e il tumore può essere un astrocitoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a carboplatino.

20 L'agente chemioterapico può essere vincristina, e il tumore può essere un astrocitoma, resistente a o avente una forte tendenza a diventare resistente a vincristina.

25 La presente divulgazione riguarda un metodo per il trattamento di un cancro in un soggetto che ne ha bisogno, in cui il cancro è, o ha una forte tendenza a diventare, resistente a un agente



terapeutico selezionato tra un agente chemioterapico, un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore di PI3K, un mAb/rTKI e un inibitore di serina/treonina chinasi, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano. In una forma di realizzazione, l'agente terapeutico è selezionato tra un agente chemioterapico, un inibitore di tirosina chinasi e un inibitore di serina/treonina chinasi. Ad esempio, l'agente chemioterapico può essere un taxano, l'inibitore di tirosina chinasi può essere un inibitore di EGFR, e l'inibitore di serina/treonina chinasi può essere un inibitore di BRAF o di MEK. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL.

La divulgazione riguarda un metodo per trattare un NSCLC resistente a erlotinib in un soggetto, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano. In una forma di realizzazione, il metodo comprende inoltre la somministrazione di erlotinib, o di un suo analogo o derivato, al soggetto. Il cancro può essere un cancro che esprime AXL.

La divulgazione riguarda un metodo per trattare un melanoma resistente a vemurafenib in un soggetto, in cui il melanoma presenta una mutazione in BRAF e la mutazione fornisce l'inibizione da parte di vemurafenib dell'attività di chinasi BRAF della BRAF mutante, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano. La mutazione può essere una sostituzione di amminoacido nel residuo V600, L597 e/o K601. La mutazione può essere selezionata tra V600E, V600D, V600K, L597R e



K601E. Il metodo può inoltre comprendere la somministrazione di vemurafenib, o di un suo analogo o derivato, al soggetto. L'analogo può essere dabrafenib. Il cancro può essere un cancro che esprime AXL.

La presente divulgazione riguarda un metodo per trattare un
5 cancro cervicale resistente a paclitaxel in un soggetto, il metodo
comprendendo la somministrazione al soggetto di ADC comprendente
un anticorpo che si lega ad AXL umano. In una forma di realizzazione, il
metodo comprende inoltre la somministrazione di paclitaxel, o di un suo
analogo o derivato, al soggetto. Il cancro può essere un cancro che
10 esprime AXL.

Per quanto riguarda l'AXL-ADC, un medico esperto nel settore
può facilmente determinare e prescrivere la quantità efficace della
composizione farmaceutica necessaria. In relazione a ciò, quando ci si
riferisce a una composizione farmaceutica è da intendersi anche
15 comprendere una composizione in quanto tale, o viceversa. Ad esempio,
il medico potrebbe iniziare con dosi dell'AXL-ADC impiegato nella
composizione farmaceutica a livelli più bassi di quanto necessario per
raggiungere l'effetto terapeutico desiderato e aumentare gradualmente il
dosaggio fino a che non si ottiene l'effetto desiderato. In generale, una
20 dose adeguata sarà la quantità del composto che è la dose più bassa
efficace per produrre un effetto terapeutico secondo un particolare
schema posologico. Una tale dose efficace dipenderà generalmente dai
fattori sopra descritti.

Ad esempio, una "quantità efficace" per uso terapeutico può
25 essere misurata mediante la sua capacità di stabilizzare la progressione



della malattia. La capacità di un composto di inibire il cancro può, ad esempio, essere valutata in un sistema di modello animale predittivo dell'efficacia in tumori umani. In alternativa, questa proprietà di una composizione può essere valutata esaminando la capacità del composto di inibire la crescita cellulare o di indurre citotossicità mediante saggi *in vitro* noti al medico esperto. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto terapeutico può ridurre la dimensione del tumore, o altrimenti migliorare i sintomi in un soggetto. Un esperto nel settore sarà in grado di determinare tali quantità sulla base di fattori come la dimensione del soggetto, la gravità dei sintomi del soggetto e la particolare composizione o via di somministrazione selezionata. Ad esempio, come già indicato, possono essere usate le linee guida della "National Comprehensive Cancer Network" (NCCN, www.nccn.org) e dell'"European Society for Medical Oncology" (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) per valutare trattamenti del cancro.

Un intervallo esemplificativo, non limitativo per una quantità terapeuticamente efficace di AXL-ADC dell'invenzione è 0,02-100 mg/kg, come circa 0,02-30 mg/kg, come circa 0,05-10 mg/kg, 0,1-5 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, ad esempio circa 0,5-3 mg/kg o 0,5-2 mg/kg.

La somministrazione può avvenire ad esempio per via endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale o sottocutanea, e ad esempio essere somministrata vicino al sito del bersaglio.

Gli schemi posologici nei metodi e negli usi di trattamento di cui sopra sono regolati per fornire la risposta desiderata ottimale (ad es. una risposta terapeutica). Ad esempio, può essere somministrato un



singolo bolo, più dosi divise possono essere somministrate nel tempo o la dose può essere ridotta o aumentata proporzionalmente come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica.

In una forma di realizzazione, la finestra di efficacia-sicurezza è ottimizzata riducendo la tossicità specifica come ad esempio riducendo il rapporto farmaco-anticorpo (“Drug-Antibody Ratio”, DAR) e/o miscelando AXL-ADC con anticorpo anti-AXL non marcato.

L’efficacia del trattamento può essere monitorata durante la terapia, ad es. a punti predefiniti nel tempo. I metodi per misurare l’efficacia dipendono generalmente dal particolare tipo di cancro e sono ben noti a un esperto nel settore. L’efficacia può essere monitorata, mediante visualizzazione delle aree di malattia, o mediante altri metodi diagnostici descritti più avanti in questo testo, ad es. eseguendo una o più scansioni PET-CT, ad esempio usando un anticorpo anti-AXL, frammento o mino-anticorpo derivato da un anticorpo specifico per AXL marcati.

Se desiderato, una dose giornaliera efficace di un AXL-ADC può essere due, tre, quattro, cinque, sei o più sottodosi somministrate separatamente a intervalli appropriati durante il giorno, facoltativamente, in forme di dosaggio unitarie. Gli AXL-ADC possono essere somministrati mediante lenta infusione continua su un lungo periodo, come più di 24 ore, al fine di minimizzare qualsiasi effetto collaterale indesiderato.

Una dose efficace di un AXL-ADC può anche essere somministrata usando un periodo di somministrazione settimanale,



bisettimanale o trisettimanale. Il periodo di somministrazione può essere limitato, ad es., 8 settimane, 12 settimane o fino a che non è stata raggiunta una progressione clinica. In una forma di realizzazione, un AXL-ADC è somministrato una volta ogni 3 settimane (1Q3W) o tre
5 somministrazioni su 4 settimane (3Q4W), in modo tale che il paziente riceve sedici o dodici cicli di AXL-ADC a intervalli di tre o quattro settimane per, ad es., 48 settimane, prolungando o ripetendo lo schema come necessario.

Ad esempio, in una forma di realizzazione, l'AXL-ADC può
10 essere somministrato mediante infusione in un dosaggio settimanale tra 10 e 500 mg/m², come tra 200 e 400 mg/m². Tale somministrazione può esser ripetuta, ad es., da 1 a 8 volte, come da 3 a 5 volte. La somministrazione può essere eseguita mediante infusione continua su un periodo di da 1 a 24 ore, come da 1 a 12 ore.

15 L'AXL-ADC può essere somministrato mediante infusione ogni tre settimane in un dosaggio tra 10 e 500 mg/m², come tra 50-200 mg/m². Tale somministrazione può esser ripetuta, ad es., da 1 a 8 volte, come da 3 a 5 volte. La somministrazione può essere eseguita mediante infusione continua su un periodo di da 1 a 24 ore, come da 1 a 12 ore.

20 Un AXL-ADC può essere somministrato come singola dose di circa 0,1-10 mg/kg, come circa 1-3 mg/kg, ogni settimana od ogni tre settimane per fino a dodici volte, fino a otto volte, o fino alla progressione clinica. La somministrazione può essere eseguita mediante infusione continua su un periodo di da 1 a 24 ore, come da 1 a 12 ore.

25 Tali schemi possono essere ripetuti una o più volte come necessario, ad



esempio, dopo 6 mesi o 12 mesi. Il dosaggio può essere determinato o regolato misurando la quantità di composto della presente invenzione nel sangue in seguito alla somministrazione, ad esempio prelevando un campione biologico e usando anticorpi anti-idiotipo che bersagliano la regione di legame all'antigene degli anticorpi anti-AXL.

Gli AXL-ADC possono essere somministrati come terapia di mantenimento, come, ad es., una volta a settimana per un periodo di sei mesi o più. Come usato qui, "terapia di mantenimento" significa terapia allo scopo di impedire o ritardare la progressione o il ritorno del cancro. Tipicamente, se un cancro è in completa remissione dopo il trattamento iniziale, si può usare terapia di mantenimento per impedire o ritardare il ritorno del cancro. Se il cancro è progredito e non è stata raggiunta la completa remissione dopo il trattamento iniziale, si può usare terapia di mantenimento per rallentare la crescita del cancro, ad es., per allungare la vita del paziente.

Come esempi non limitativi, il trattamento secondo la presente divulgazione può essere fornito come una somministrazione quotidiana di un composto secondo la presente invenzione in una quantità di circa 0,1-100 mg/kg, come circa 0,1-50 mg/kg, come circa 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al giorno, ad almeno uno dei giorni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o in alternativa, almeno una delle settimane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,



18, 19 o 20 dopo l'inizio del trattamento, o qualsiasi loro combinazione, usando dosi singole o divise ogni 24, 12, 8, 6, 4, o 2 ore, o qualsiasi loro combinazione

5 Composizioni parenterali possono essere formulate in forma unitaria di dosaggio per la facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Le forme unitarie di dosaggio come usato qui si riferiscono a unità fisicamente separate adatte come dosaggi unitari per i soggetti da trattare; ciascuna unità contiene una quantità predeterminata di composto attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in
10 associazione con il veicolo farmaceutico necessario. Le specifiche per le forme unitarie di dosaggio della presente invenzione sono dettate da e direttamente dipendenti da (a) le caratteristiche uniche del composto attivo e il particolare effetto terapeutico da raggiungere, e (b) le limitazioni intrinseche alla tecnica di preparazione di un tale composto
15 attivo per il trattamento della sensibilità negli individui.

Come qui descritto, il AXL-ADC può essere usato in combinazione con almeno un agente terapeutico aggiuntivo. L'almeno un agente terapeutico aggiuntivo può comprendere, o essere costituito da, l'agente chemioterapico, inibitore di tirosina chinasi, inibitore di
20 PI3K, mAb/rTKI e/o inibitore di serina/treonina chinasi al quale il cancro o tumore è resistente o ha una forte tendenza a sviluppare resistenza ad esso, come esposto nelle forme di realizzazione precedenti.

L'AXL-ADC e gli uno o più agenti terapeutici possono essere somministrati contemporaneamente, separatamente o sequenzialmente.
25 Ad esempio, in una forma di realizzazione, la combinazione è usata per



trattare un paziente affetto da cancro che non ha precedentemente ricevuto un trattamento con l' almeno un agente terapeutico. In un'altra forma di realizzazione, la combinazione è usata per trattare un paziente affetto da cancro nel quale un trattamento precedente con l' almeno un agente terapeutico non ha avuto successo. I dosaggi e gli schemi posologici efficaci per l'AXL-ADC e agente/i terapeutico/i dipendono dal neoplasma, tumore o cancro da trattare e possono essere determinati da un esperto nel settore.

I dosaggi e gli schemi posologici per l'uno o più agente/i terapeutico/i da usare insieme al AXL-ADC possono essere gli stessi o essenzialmente simili a quelli normalmente usati nel trattamento di tale neoplasma, tumore o cancro con l'uno o più agente/i terapeutico/i. I dosaggi dell'/degli agente/i terapeutico/i possono essere inferiori a quelli normalmente usati, ma lo schema posologico diversamente può essere simile. I dosaggi dell'/degli agente/i terapeutico/i possono essere simili a quelli normalmente usati, ma lo schema posologico regolato su meno somministrazioni o su somministrazioni meno frequenti.

Quindi, in un aspetto, l'invenzione riguarda un metodo per il trattamento di un cancro in un soggetto che ne ha bisogno, in cui il cancro è, o ha una forte tendenza a diventare, resistente a un agente terapeutico selezionato tra un agente chemioterapico, un inibitore di tirosina chinasi e un inibitore di serina/treonina chinasi, comprendente la somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano e (ii) l'agente terapeutico. In una forma di realizzazione, l'agente chemioterapico è un taxano, l'inibitore di



tirosina chinasi è un inibitore di EGFR, e l'inibitore di serina/treonina chinasi un inibitore di BRAF o di MEK. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL. L'AXL-ADC può, ad es., essere somministrato in una quantità terapeuticamente efficace secondo uno
5 schema posologico descritto più dettagliatamente sopra. Ad esempio, come esempio non limitativo, l'AXL-ADC può essere somministrato in una quantità di circa 0,02-100 mg/kg, come circa 0,02-30 mg/kg, come circa 0,05-10 mg/kg ogni 1 settimana (1Q1W), ogni 2 settimane (1Q2W) o ogni 3 settimane (1Q3W) o tre somministrazioni su 4 settimane
10 (3Q4W) in modo tale che il paziente riceva sedici o dodici cicli di AXL-ADC a intervalli di tre settimane o di quattro settimane per, ad es., 48 settimane, prolungando, accorciando o ripetendo lo schema come determinato dal medico responsabile.

In una forma di realizzazione, l'invenzione riguarda un metodo
15 per trattare un NSCLC resistente a erlotinib in un soggetto, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano e (ii) erlotinib, o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace. L'erlotinib può, ad esempio, essere somministrato per via orale a una dose da 50 a 300 mg,
20 come 100-200 mg, come circa 150 mg, una o due volte al giorno, od ogni 2 o 3 giorni. Preferibilmente, l'erlotinib è somministrato una volta al giorno a una dose di circa 150 mg. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL.

In una forma di realizzazione, l'invenzione riguarda un metodo
25 per trattare un melanoma resistente a vemurafenib in un soggetto, in



cui il melanoma presenta una mutazione in BRAF e la mutazione fornisce l'inibizione da parte di vemurafenib dell'attività di chinasi BRAF della BRAF mutante, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano e (ii) vemurafenib, o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL. In una forma di realizzazione, la mutazione è una sostituzione di amminoacido nel residuo V600, L597 e/o K601. In una forma di realizzazione, la mutazione è selezionata tra V600E, V600D, V600K, L597R e K601E. Il vemurafenib può, ad esempio, essere somministrato per via orale a una dose di circa 200-2000 mg, 500-1500 mg, come circa 1000 mg al giorno, ad es., 960 mg, somministrato come 4 x compresse da 240 mg ogni 12 ore (circa separate da 12 ore).

La presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un melanoma resistente a dabrafenib in un soggetto, in cui il melanoma presenta una mutazione in BRAF e la mutazione fornisce l'inibizione da parte di dabrafenib dell'attività di chinasi BRAF della BRAF mutante, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano e (ii) dabrafenib, o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL. La mutazione può essere una sostituzione di amminoacido nel residuo V600, L597 e/o K601. La mutazione può essere selezionata tra V600E, V600D, V600K, L597R e K601E. Il dabrafenib può, ad esempio, essere somministrato per via orale al soggetto a una dose di circa 50-300 mg, come circa 100-



200 mg, come circa 150 mg, una o due volte al giorno, od ogni 2 o 3 giorni. Preferibilmente, il dabrafenib è somministrato come 150 mg per via orale due volte al giorno, ad es., almeno 1 ora prima di un pasto o almeno 2 ore dopo un pasto.

5 La presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un melanoma resistente a dabrafenib, trametinib o entrambi in un soggetto, in cui il melanoma presenta una mutazione in BRAF e la mutazione fornisce l'inibizione da parte di dabrafenib dell'attività di chinasi BRAF della BRAF mutante, il metodo comprendendo la
10 somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano, (ii) dabrafenib, o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace e (iii) trametinib o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace. Il cancro può essere un cancro che esprime AXL. La mutazione può essere una sostituzione di amminoacido nel
15 residuo V600, L597 e/o K601. La mutazione può essere selezionata tra V600E, V600D, V600K, L597R e K601E. Il dabrafenib può, ad esempio, essere somministrato per via orale al soggetto a una dose di circa 50-300 mg, come circa 100-200 mg, come circa 150 mg, una o due volte al giorno, od ogni 2 o 3 giorni. Preferibilmente, il dabrafenib è
20 somministrato come 150 mg per via orale due volte al giorno, ad es., almeno 1 ora prima di un pasto o almeno 2 ore dopo un pasto. Il trametinib può, ad esempio, essere somministrato per via orale a una dose da circa 0,5 a 5 mg, come da circa 1 a 4 mg, come circa 2-3 mg, come circa 2 mg, una o due volte al giorno od ogni 2, 3 o 4 giorni, come
25 una volta al giorno.



La presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un cancro cervicale resistente a taxano in un soggetto, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di (i) un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano e (ii) un taxano al
5 soggetto. In una forma di realizzazione, il cancro è un cancro che esprime AXL. Preferibilmente, il taxano è paclitaxel o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace, come docetaxel. Il paclitaxel può essere somministrato per via endovenosa (ev) al soggetto, ad esempio a una dose di circa 100-500 mg/m², come circa 125-400 mg/m², come
10 circa 135 mg/m², 175 mg/m² o 250mg/m² su poche ore (ad es. 3 ore), e il trattamento ripetuto ogni 1, 2, 3, 4, 5 settimane, come ogni 3 settimane. In alternativa, il paclitaxel può essere somministrato per via endovenosa come paclitaxel legato ad albumina (nab-paclitaxel), ad es., a una dose di circa 50-400 mg/m², come circa 75-300 mg/m², come
15 circa 100-200 mg/m², come circa 125 mg/m² su un periodo da 30 minuti a 1 ora o più e una volta a settimana, e ripetendo il trattamento due volte a settimana, o una volta ogni 2 o 3 settimane, ad es., una volta a settimana. Il docetaxel può essere a sua volta somministrato per via ev a una dose di circa 25-500 mg/m², come circa 50-300 mg/m²,
20 come circa 75-200 mg/m², come circa 100 mg/m² su da 30 minuti fino a 2 ore, come 1 ora, e il trattamento ripetuto ogni 1, 2, 3, 4 o 5 settimane, come ogni 3 settimane.

In un particolare, l'AXL-ADC può essere usato, da solo o in combinazione con l'agente terapeutico, per trattare cancro recidivo in
25 un soggetto, dove il cancro si ripresentava dopo un trattamento iniziale



con l'agente terapeutico. Se il cancro dovesse ripresentarsi ancora dopo il trattamento iniziale con AXL-ADC, l'AXL-ADC può essere usato di nuovo, da solo o insieme all'agente terapeutico, per trattare il cancro recidivo.

- 5 La presente divulgazione fornisce un metodo per selezionare un soggetto affetto da un cancro per il trattamento con una combinazione di un AXL-ADC e un agente terapeutico selezionato tra un agente chemioterapico, un TKI, un PI3Ki, un mAb/rTKI e un S/Th KI, comprendente determinare
- 10 (a) se il soggetto soddisfa i criteri per il trattamento con un agente chemioterapico, un TKI, un PI3Ki, un mAb/rTKI o un S/Th KI;
- (b) se l'espressione di AXL nel cancro è associata alla resistenza al TKI o al S/Th K; e
- (c) selezionare un soggetto che soddisfa i criteri per un trattamento
- 15 con il TKI o con il S/Th KI e che è affetto da un cancro per il quale l'espressione di AXL è associata a resistenza al TKI o a S/Th KI. In una forma di realizzazione, l'agente terapeutico è un agente chemioterapico, un TKI o un S/Th KI.

La presente divulgazione fornisce un metodo per il

20 trattamento di un soggetto a cui è stato diagnosticato un melanoma che è, o ha una forte tendenza a diventare, resistente a vemurafenib o a un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace, comprendente la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano.

25 La presente divulgazione fornisce un metodo per determinare



se un soggetto affetto da melanoma sia adatto al trattamento con una
combinazione di (i) vemurafenib o un suo analogo o derivato
terapeuticamente efficace e (ii) un ADC comprendente un anticorpo che
si lega ad AXL umano, in cui il soggetto è sottoposto o è stato sottoposto
5 a trattamento con vemurafenib (o con l'analogo o il derivato), ed è stato
determinato o si sospetta che egli sia resistente al vemurafenib (o
all'analogo o al derivato), il che quindi determina che il soggetto è adatto
al trattamento. Si può determinare se il melanoma esprime AXL. In una
forma di realizzazione, l'analogo è dabrafenib.

10 La presente divulgazione fornisce un metodo per il
trattamento di un soggetto a cui è stato diagnosticato un cancro
cervicale che è, o ha una forte tendenza a diventare, resistente a
paclitaxel o a un suo analogo o derivato therapeuticamente efficace, come
un altro taxano (ad es. docetaxel), comprendente la somministrazione di
15 una quantità therapeuticamente efficace di un ADC comprendente un
anticorpo che si lega ad AXL umano.

La presente divulgazione fornisce un metodo per determinare
se un soggetto affetto da cancro cervicale sia adatto al trattamento con
una combinazione di (i) paclitaxel o un suo analogo o derivato
20 therapeuticamente efficace, come un altro taxano (ad es. docetaxel), e (ii)
un ADC comprendente un anticorpo che si lega ad AXL umano, in cui il
soggetto è sottoposto o è stato sottoposto a trattamento con paclitaxel
ed è stato determinato o si sospetta che egli sia resistente al paclitaxel,
il che quindi determina che il soggetto è adatto al trattamento. In un
25 ulteriore aspetto si può determinare se il cancro cervicale esprime AXL.



Può essere stato determinato che il neoplasma, tumore o cancro resistente da trattare con un ADC anti-AXL (“anti-AXL-ADC”) esprime AXL.

Si può riuscire a fare ciò rilevando i livelli dell’antigene AXL o i
5 livelli di cellule che esprimono AXL sulla loro superficie cellulare in un campione prelevato da un paziente. Il paziente può, ad esempio, essere affetto da un cancro cervicale, melanoma o NSCLC. L’antigene AXL da rilevare può essere un antigene AXL solubile, un antigene AXL associato a cellula o entrambi. Il campione da testare può, ad esempio, essere
10 messo a contatto con un anticorpo anti-AXL in condizioni che consentono il legame dell’anticorpo a AXL, facoltativamente parallelamente a un campione di controllo e/o anticorpo di controllo che si lega a un antigene irrilevante. Il legame dell’anticorpo a AXL può essere rilevato (ad es. usando un ELISA). Quando si usa un campione di
15 controllo parallelamente al campione da testare, il livello di anticorpo anti-AXL o complesso AXL anticorpo anti-AXL è analizzato in entrambi i campioni e un livello maggiore statisticamente significativo di anticorpo anti-AXL o complesso AXL anticorpo anti-AXL nel campione da testare mostra un livello maggiore di AXL nel campione da testare in confronto
20 al campione di controllo, il che indica una maggiore espressione di AXL. Esempi di saggi immunologici convenzionali utili per tali propositi includono, senza limitazione, ELISA, RIA, saggi FACS, saggi di risonanza plasmonica, saggi cromatografici, immunoistochimica di tessuto, Western Blot e/o immunoprecipitazione.

25 Un campione di tessuto può essere prelevato da un tessuto



che è noto contenere, o si sospetta contenga, l'antigene AXL e/o cellule che esprimono l'antigene AXL. Ad esempio, la rilevazione in situ dell'espressione di AXL può essere compiuta rimuovendo un campione istologico come una biopsia di tumore o campione di sangue da un
5 paziente, e fornendo l'anticorpo anti-AXL a tale campione dopo adeguata preparazione del campione. L'anticorpo può essere fornito applicando o ricoprendo l'anticorpo al campione, che è poi rilevato usando mezzi adeguati.

Nei saggi di cui sopra, l'anticorpo anti-AXL può essere
10 marcato con una sostanza rilevabile per consentire di rilevare l'anticorpo legato a AXL.

Il livello di AXL espresso sulle cellule in un campione può anche essere determinato secondo il metodo descritto nell'Esempio 23, dove l'espressione di AXL sulla membrana plasmatica di linee cellulari
15 di tumore umane è stata quantificata mediante immunofluorescenza indiretta usando analisi QIFIKIT (DAKO, Cat nr K0078), usando un anticorpo anti-AXL monoclonale (qui: anticorpo monoclonale murino ab89224, Abcam, Cambridge, Regno Unito). In breve, è preparata, e facoltativamente lavata, una sospensione di cellule singole. Le fasi
20 successive sono eseguite su ghiaccio. Le cellule sono seminate, ad es. a 100.000 cellule a pozzetto o provetta, e successivamente rese pellet e risospese in 50 µL di campione di anticorpo a una concentrazione di 10 µg/mL, aggiungendo facoltativamente un anticorpo di controllo a un campione parallelo. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 4°C, le cellule
25 sono rese pellet e risospese in 150 µL di tampone FACS, e la quantità di

AXL determinata mediante analisi FACS usando, ad es., un anticorpo secondario, marcato con FITC, che si lega agli anticorpi anti-AXL e di controllo. Per ciascuna linea cellulare, la capacità di legare l'anticorpo ("Antibody Binding Capacity", ABC), una stima del numero di molecole di AXL espresse sulla membrana plasmatica, è stata calcolata usando l'intensità media di fluorescenza delle cellule colorate con anticorpo contro AXL, sulla base dell'equazione di una curva di calibrazione come descritta nell'Esempio 23 (interpolazione di incognite dalla curva standard). Usando il metodo dell'Esempio 23, il livello di AXL sulle cellule che esprimono AXL può essere stimato essere almeno 5000, come almeno 8000, come almeno 13000.

La presenza o il livello di cellule che esprimono AXL in un neoplasma, tumore o cancro può essere valutata mediante imaging *in vivo* di anticorpi anti-AXL marcati in modo rilevabile secondo metodi noti nel settore. Un segnale significativamente maggiore da un sito, come il sito noto o sospettato di un tumore, rispetto allo sfondo o ad altri controlli indica sovraespressione di AXL nel tumore o nel cancro.

AXL-ADC

Gli ADC adatti all'uso nel contesto della presente invenzione possono essere preparati da qualsiasi anticorpo anti-AXL. Gli anticorpi anti-AXL preferiti sono caratterizzati da una o più delle proprietà di legame ad AXL, sequenze variabili o ipervariabili, o una combinazione di proprietà di legame e di sequenza, esposte negli aspetti e nelle forme di realizzazione di seguito. In particolare, l'anticorpo può essere uno che si lega ad AXL ma non compete per il legame ad AXL con il ligando



specifico per l'arresto della crescita 6 (Gas6). Sono massimamente preferiti gli anticorpi anti-AXL specifici le cui sequenze sono descritte nella Tabella 4, in particolare l'anticorpo denominato 107 e gli anticorpi che condividono con l'anticorpo 107 una o più proprietà di legame ad
5 AXL o sequenze CDR, VH e/o VL.

Quindi, in una particolare forma di realizzazione di un qualsiasi aspetto o forma di realizzazione precedente, l'anticorpo anti-AXL comprende almeno una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL, in cui la regione VH comprende le
10 sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, e la regione VL comprende le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40.

L'ADC può comprendere un tale anticorpo anti-AXL collegato a un agente citotossico che è un'auristatina o un suo analogo o derivato
15 peptidico funzionale, come, ad es., monometil auristatina E, preferibilmente mediante un linker di maleimidocaproil-valina-citrullina-p-amminobenzilossicarbonile (mc-vc-PAB).

Il termine "anticorpo" come usato qui è inteso riferirsi a una molecola di immunoglobulina, un frammento di una molecola di
20 immunoglobulina o un derivato di uno di essi, che ha la capacità di legarsi specificamente a un antigene in condizioni fisiologiche tipiche e/o specifiche per un tumore con un'emivita di periodi di tempo significativi, come almeno circa 30 minuti, almeno circa 45 minuti, almeno circa un'ora, almeno circa due ore, almeno circa quattro ore,
25 almeno circa 8 ore, almeno circa 12 ore, circa 24 ore o più, circa 48 ore



o più, circa 3, 4, 5, 6, 7 o più giorni, ecc., o qualsiasi altro periodo funzionalmente definito rilevante (come un tempo sufficiente a indurre, promuovere, potenziare e/o modulare una risposta fisiologica associata al legame dell'anticorpo all'antigene e/o tempo sufficiente affinché l'anticorpo sia internalizzato). La regione di legame (o dominio di legame che può essere usato qui, entrambi aventi lo stesso significato) che interagisce con un antigene, comprende regioni variabili sia delle catene pesanti sia delle catene leggere della molecola di immunoglobulina. Le regioni costanti degli anticorpi (Ab) possono mediare il legame dell'immunoglobulina a fattori o tessuti ospiti, incluse varie cellule del sistema immunitario (come le cellule effettrici) e componenti del sistema del complemento come C1q, il primo componente nella classica via dell'attivazione del complemento. Come indicato sopra, il termine anticorpo come usato qui, a meno che non sia affermato diversamente o che non sia chiaramente in contraddizione con il contesto, include frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di interagire specificamente, come legarsi, con l'antigene. È stato mostrato che la funzione di legame all'antigene di un anticorpo può essere compiuta da frammenti di un anticorpo di lunghezza intera. Esempi di frammenti leganti compresi all'interno del termine "anticorpo" includono (i) un frammento Fab' o Fab, un frammento monovalente costituito dai domini VL, VH, CL e CH1, o un anticorpo monovalente come descritto in WO 2007/059782; (ii) frammenti $F(ab')_2$, frammenti bivalenti comprendenti due frammenti Fab collegati mediante un ponte disolfuro in corrispondenza della regione di cerniera; (iii) un frammento Fd



costituito essenzialmente dai domini VH e CH1; (iv) un frammento Fv costituito essenzialmente dai domini VL e VH di un singolo braccio di un anticorpo, (v) un frammento dAb (Ward *et al.*, 1989), che è costituito essenzialmente da un dominio VH ed è anche chiamato “domain antibody” (Holt *et al.*, 2003); (vi) “camelid” o “nanobody” (Revets *et al.*, 2005) e (vii) una regione determinante la complementarità (CDR) isolata. Inoltre, sebbene i due domini del frammento Fv, VL e VH, siano codificati da geni separati, essi possono essere uniti, usando metodi ricombinanti, mediante un linker sintetico che rende possibile realizzarli come una singola catena proteica in cui le regioni VL e VH si accoppiano per formare molecole monovalenti (note come anticorpi a catena singola o Fv a catena singola (“single chain Fv”, scFv), si vedano ad esempio Bird *et al.* (1988) e Huston *et al.* (1988). Tali anticorpi a catena singola sono compresi all’interno del termine anticorpo, a meno che non sia fatto notare o indicato chiaramente dal contesto altrimenti. Sebbene tali frammenti siano generalmente inclusi all’interno del significato di anticorpo, essi sono collettivamente ed ognuno singolarmente caratteristiche uniche della presente invenzione, esibendo diverse proprietà biologiche e utilità. Questi e altri frammenti utili di anticorpo nel contesto della presente invenzione sono qui descritti ulteriormente. Deve anche essere compreso che il termine anticorpo, se non specificato altrimenti, include anche anticorpi policlonali, anticorpi monoclonali (mAb), polipeptidi analoghi ad anticorpo, come anticorpi chimerici e anticorpi umanizzati, così come “frammenti di anticorpo/i” o “suoi/loro frammenti” che conservano la



capacità di legarsi specificamente all'antigene (frammenti leganti l'antigene) forniti mediante qualsiasi tecnica nota, come scissione enzimatica, sintesi di peptide e tecniche ricombinanti, e che conservano la capacità di essere coniugati con una tossina. Un anticorpo così
5 generato può possedere qualsiasi isotipo.

Il termine "catena pesante di immunoglobulina" o "catena pesante di un'immunoglobulina" come usato qui è inteso riferirsi a una delle catene pesanti di un'immunoglobulina. Una catena pesante è tipicamente costituita da una regione variabile di catena pesante (qui
10 abbreviata come VH) e una regione costante di catena pesante (qui abbreviata come CH) che definisce l'isotipo dell'immunoglobulina. La regione costante di catena pesante è tipicamente costituita da tre domini, CH1, CH2 e CH3. Il termine "immunoglobulina" come usato qui è inteso riferirsi a una classe di glicoproteine strutturalmente correlate
15 costituite da due coppie di catene polipeptidiche, una coppia di catene a basso peso molecolare leggere ("light", L) e una coppia di catene pesanti ("heavy", H), tutte e quattro potenzialmente interconnesse mediante ponti disolfuro. La struttura delle immunoglobuline è stata ben caratterizzata (si veda ad esempio Fundamental Immunology Ch. 7
20 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989). All'interno della struttura dell'immunoglobulina, le due catene pesanti sono interconnesse mediante ponti disolfuro nella cosiddetta "regione di cerniera". Ugualmente alle catene pesanti, ciascuna catena leggera è tipicamente costituita da più regioni; una regione variabile di catena
25 leggera (qui abbreviata come VL) e una regione costante di catena



leggera. La regione costante di catena leggera è tipicamente costituita da un dominio, CL. Inoltre, le regioni VH e VL possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità (o regioni ipervariabili che possono essere ipervariabili in sequenza e/o forma di anse strutturalmente definite), anche definite regioni determinanti la complementarità (CDR), inframezzate con regioni che sono più conservate, definite regioni di “framework” (FR). Ciascuna VH e VL è tipicamente composta da tre CDR e quattro FR, disposte da ammino-terminale a carbossi-terminale nel seguente ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le sequenze CDR sono definite secondo IMGT (si vedano Lefranc *et al.* (1999) e Brochet *et al.* (2008)).

Il termine “regione legante l’antigene” o “regione di legame” come usato qui, si riferisce a una regione di un anticorpo che è in grado di legarsi all’antigene. L’antigene può essere qualsiasi molecola, come un polipeptide, ad es. presente su una cellula, batterio o virione. I termini “antigene” e “bersaglio” possono, a meno che non sia chiaramente in contraddizione con il contesto, essere usati in modo intercambiabile nel contesto della presente invenzione.

Il termine “legame” come usato qui si riferisce al legame di un anticorpo a un antigene o bersaglio predeterminato, tipicamente con un’affinità di legame corrispondente a una K_D di circa 10^{-6} M o meno, *e.g.* 10^{-7} M o meno, come circa 10^{-8} M o meno, come circa 10^{-9} M o meno, circa 10^{-10} M o meno, o circa 10^{-11} M o persino meno quando determinato ad esempio mediante tecnologia di risonanza plasmonica di superficie (SPR) in uno strumento BIAcore 3000 usando l’antigene come



ligando e la proteina come analita, e si lega all'antigene predeterminato con un'affinità corrispondente a una K_D che è almeno dieci volte inferiore, come almeno 100 volte inferiore, ad esempio almeno 1.000 volte inferiore, come almeno 10.000 volte inferiore, ad esempio almeno 100.000 inferiore alla sua attività per legare un antigene non specifico (ad es., BSA, caseina) diverso dall'antigene predeterminato o un antigene strettamente correlato. La quantità con la quale l'affinità è inferiore dipende dalla K_D della proteina, in modo che quando la K_D della proteina è molto bassa (ossia, la proteina è altamente specifica), la quantità con cui l'affinità per l'antigene è inferiore all'affinità per un antigene non specifico può essere almeno 10.000 volte. Il termine " K_D " (M), come usato qui, si riferisce alla costante di dissociazione di una particolare interazione anticorpo-antigene ed è ottenuta dividendo k_d per k_a .

15 Il termine " k_d " (sec^{-1}), come usato qui, si riferisce alla costante di velocità di dissociazione di una particolare interazione anticorpo-antigene. Detto valore è anche indicato come il valore k_{off} o "off-rate".

Il termine " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$), come usato qui, si riferisce alla costante di velocità di associazione di una particolare interazione anticorpo-antigene. Detto valore è anche indicato come il valore k_{on} o "on-rate".

20 Il termine " K_A " (M^{-1}), come usato qui, si riferisce alla costante di associazione di una particolare interazione anticorpo-antigene ed è ottenuta dividendo k_a per k_d .

25 Il termine "AXL" come usato qui si riferisce alla proteina

denominata AXL, che è anche indicata come UFO o JTK11, una proteina da 894 amminoacidi con un peso molecolare di 104-140 kDA che è parte della sottofamiglia dei recettori tirosin chinasi (RTK) TAM dei mammiferi. Il peso molecolare è variabile a causa di potenziali
5 differenze nella glicosilazione della proteina. La proteina AXL è costituita da due domini di tipo immunoglobulinico (di tipo Ig) extracellulari sull'estremità N-terminale della proteina, due domini di tipo III di fibronectina (FNIII) extracellulari prossimali rispetto alla membrana, un dominio transmembrana e un dominio chinasi intracellulare. AXL è
10 attivato in seguito al legame del suo ligando Gas6, mediante interazioni omofiliche indipendenti dal ligando tra i domini extracellulari di AXL, mediante autofosforilazione in presenza di specie reattive dell'ossigeno (Korshunov *et al.*, 2012) o mediante transattivazione attraverso EGFR (Meyer *et al.*, 2013) ed è espresso in modo anormale in più tipi di
15 tumore. Negli esseri umani, la proteina AXL è codificata da una sequenza di acido nucleico che codifica per la sequenza amminoacidica mostrata in SEQ ID n. 130 (proteina AXL umana: Swissprot P30530; proteina AXL di cynomolgus: nr. di accesso Genbank HB387229.1)).

Il termine “interazioni omofiliche indipendenti dal ligando”
20 come usato qui si riferisce all'associazione tra due molecole di AXL (espresse su cellule vicine) che avviene in assenza del ligando.

Il termine “anticorpo che si lega ad AXL” come usato qui si riferisce a qualsiasi anticorpo che si lega a un epitopo sulla parte extracellulare di AXL.

25 Il termine “epitopo” significa un determinante di proteina in

grado di legarsi specificamente a un anticorpo. Gli epitopi sono generalmente costituiti da raggruppamenti superficiali di molecole come amminoacidi, catene laterali di zucchero o una loro combinazione e solitamente hanno specifiche caratteristiche strutturali tridimensionali, 5 così come specifiche caratteristiche di carica. Gli epitopi conformazionali e non conformazionali si distinguono per il fatto che il legame al primo ma non al secondo va perduto in presenza di solventi denaturanti. L'epitopo può comprendere residui amminoacidici che sono direttamente coinvolti nel legame, e altri residui amminoacidici, 10 che non sono direttamente coinvolti nel legame, come residui amminoacidici che sono efficacemente bloccati o ricoperti dallo specifico peptide che lega l'antigene (in altre parole, il residuo amminoacidico è all'interno del "footprint" dello specifico peptide che lega l'antigene).

Il termine "ligando" come usato qui si riferisce a una sostanza, 15 come un ormone, peptide, ione, farmaco o proteina, che si lega specificamente e reversibilmente a un'altra proteina, come un recettore, per formare un complesso più grande. Il legame del ligando a un recettore può alterare la sua conformazione chimica, e determina il suo stato funzionale. Ad esempio, un ligando può funzionare come agonista 20 o antagonista.

Il termine "specifico per l'arresto della crescita 6" o "Gas6" come usato qui si riferisce a una proteina da 721 amminoacidi, con un peso molecolare di 75-80 kDa, che funziona come ligando per la famiglia TAM di recettori, incluso AXL. Gas6 è composto da una regione 25 N-terminale contenente molteplici residui di acido gamma-

carbossiglutammino (Gla), che sono responsabili dell'interazione specifica con la membrana fosfolipidica caricata negativa. Sebbene il dominio Gla non sia necessario per il legame di Gas6 a AXL, è necessario per l'attivazione di AXL. Gas6 può anche essere denominato
5 il "ligando a AXL".

I termini "anticorpo monoclonale", "Ab monoclonale", "composizione di anticorpo monoclonale", "mAb" o simili, come usati qui, si riferiscono a una preparazione di molecole di anticorpo di singola composizione molecolare. Una composizione di anticorpo monoclonale
10 presenta una singola affinità e specificità di legame unica per un particolare epitopo. Di conseguenza, il termine "anticorpo monoclonale umano" si riferisce ad anticorpi che presentano una singola specificità di legame che hanno regioni variabili e costanti derivate da sequenze di immunoglobulina di linea germinale umana. Gli anticorpi monoclonali
15 umani possono essere prodotti mediante un ibridoma che include una cellula B ottenuta da un animale non umano transgenico o transcromosomico, come un topo transgenico, avente un genoma comprendente un transgene di catena pesante e un transgene di catena leggera umani, fusi a una cellula immortalizzata.

20 Nel contesto della presente invenzione, il termine "ADC" si riferisce a un coniugato anticorpo farmaco, che nel contesto della presente invenzione si riferisce a un anticorpo anti-AXL che è accoppiato a una porzione terapeutica, ad es. una porzione citotossica come descritto nella presente domanda. Esso può ad es. essere
25 accoppiato con un linker a, ad es., una cisteina o con altri metodi di



coniugazione ad altri amminoacidi. La porzione può ad es. essere un farmaco o una tossina o simili.

Come usato qui, una “porzione terapeutica” significa un composto che esercita un effetto terapeutico o preventivo quando
5 somministrato a un soggetto, in particolare quando somministrato come un ADC come qui descritto. Una porzione “citotossica” o “citostatica” è un composto che è dannoso per (ad es. uccide) le cellule. Alcune porzioni citotossiche o citostatiche per l’uso in ADC sono idrofobiche, il che significa che esse non hanno, o hanno solo limitata, solubilità in
10 acqua, ad es., 1 g/L o meno (molto leggermente solubili), come 0,8 g/L o meno, come 0,6 g/L o meno, come 0,4 g/L o meno, come 0,3 g/L o meno, come 0,2 g/L o meno, come 0,1 g/L o meno (praticamente insolubili). Porzioni citotossiche o citostatiche idrofobiche esemplificative includono, ma non sono limitate a, certi inibitori di
15 microtubulina come auristatina e suoi derivati, ad es. MMAF e MMAE, così come maytansina e suoi derivati, ad es. DM1.

L’anticorpo può avere un’affinità di legame (K_D) nell’intervallo da $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M a AXL, e in cui detta affinità di legame è misurata usando un’Interferometria di Bio-Layer usando un dominio
20 extracellulare di AXL solubile.

L’affinità di legame può essere determinata come descritto nell’Esempio 2. Pertanto, in una forma di realizzazione, l’anticorpo ha un’affinità di legame da $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M verso l’antigene, in cui l’affinità di legame è determinata mediante un metodo comprendente le
25 fasi di:



i) caricare biosensori “anti-human Fc Capture” con anticorpi anti-AXL, e

ii) determinare l’associazione e la dissociazione del dominio extracellulare di AXL ricombinante solubile mediante Interferometria di Bio-Layer a diverse concentrazioni.

Il termine “dominio extracellulare di AXL ricombinante solubile” come usato qui si riferisce a un dominio extracellulare di AXL, corrispondente agli amminoacidi 1-447 della proteina di lunghezza intera (SEQ ID No. 130, si veda l’Esempio 1) che è stato espresso in modo ricombinante. A causa dell’assenza del dominio transmembrana e intracellulare, il dominio extracellulare di AXL ricombinante non è attaccato, ad esempio, alla superficie cellulare e rimane in soluzione. È ben noto come esprimere una proteina in modo ricombinante, si veda Sambrook (1989), e pertanto rientra nella conoscenza dell’esperto fornire un tale dominio extracellulare di AXL ricombinante.

L’anticorpo può avere una velocità di dissociazione da $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ad AXL, e in cui la velocità di dissociazione è misurata mediante Interferometria di Bio-Layer usando il dominio extracellulare di AXL ricombinante solubile.

L’affinità di legame può essere determinata come descritto sopra (e nell’Esempio 2). Pertanto, in una forma di realizzazione, l’anticorpo ha una velocità di dissociazione da $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a AXL, e in cui la velocità di dissociazione è misurata mediante un metodo comprendente le fasi di

i) caricare biosensori “anti-human Fc Capture” con anticorpi



anti-AXL, e

ii) determinare l'associazione e la dissociazione del dominio extracellulare di AXL ricombinante mediante Interferometria di Bio-Layer a diverse concentrazioni.

5 Il termine "velocità di dissociazione" come usato qui si riferisce alla velocità a cui un anticorpo specifico per l'antigene legato al suo antigene si dissocia da tale antigene, ed è espressa come s^{-1} . Pertanto, nel contesto di un anticorpo che si lega ad AXL, il termine "velocità di dissociazione" si riferisce all'anticorpo che si lega ad AXL si dissocia dal
10 dominio extracellulare ricombinante di AXL ed è espressa come s^{-1} .

Gli ADC per l'uso nella presente invenzione possono comprendere una frazione anticorpo che si lega a un dominio extracellulare di AXL senza competere o interferire con il legame di Gas6 ad AXL. In particolare, l'anticorpo si può legare al dominio Ig1
15 extracellulare dominio senza competere o interferire con il legame di Gas6 ad AXL. L'anticorpo si può legare al dominio Ig1 extracellulare e mostrare non più del 20% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo può mostrare non più del 15% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo può mostrare non più del
20 10% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo può mostrare non più del 5% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo può mostrare non più del 4% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo mostrare non più del 2% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. L'anticorpo mostrare
25 non più dell'1% di riduzione nel legame di Gas6 massimo. L'anticorpo si



può legare al dominio Ig2 nel dominio extracellulare di AXL senza competere o interferire con il legame di Gas6 ad AXL. L'anticorpo si lega al dominio Ig2 nel dominio extracellulare di AXL e mostrare non più del 20%, come non più del 15%, come non più del 10%, come non più del 5%, come non più del 4%, come non più del 2%, come non più del 1% di riduzione nel legame di Gas6 ad AXL massimo. La capacità di competere con o ridurre il legame di Gas6 può essere determinata come divulgato nell'Esempio 2 o nell'Esempio 12. L'anticorpo si può legare al dominio Ig2 nel dominio extracellulare di AXL senza competere o interferire con il legame di Gas6 ad AXL massimo.

Il legame massimo dell'anticorpo in presenza di Gas6 può essere almeno 90%, come almeno 95%, come almeno 97%, come almeno 99%, come 100% del legame in assenza di Gas6 come determinato mediante saggio di competizione, in cui la competizione tra detto anticorpo che si lega ad AXL umano e detto Gas6 è determinata su cellule A431 preincubate con Gas6 e senza Gas6.

La competizione tra anti-AXL e il ligando Gas6 a AXL può essere determinata come descritto nell'Esempio 2 sotto il titolo "Interferenza del legame di anti-AXL con il legame di Gas6". Pertanto, l'anticorpo può essere uno che non compete per il legame ad AXL con il ligando Gas6, in cui la competizione per il legame è determinata in un saggio comprendente le fasi di

- i) incubare le cellule che esprimono AXL con Gas6,
- ii) aggiungere gli anticorpi anti-AXL da testare,
- iii) aggiungere un reagente secondario marcato con



fluorescenza che rileva gli anticorpi anti-AXL e

iv) analizzare le cellule mediante FACS.

L'anticorpo può essere uno che non compete per il legame con il ligando Gas6, in cui la competizione per il legame è determinata in un

5 saggio comprendente le fasi di

i) incubare le cellule che esprimono AXL con anticorpi anti-AXL,

ii) aggiungere Gas6,

10 iii) aggiungere un reagente secondario marcato con fluorescenza che rileva Gas6 e

iv) analizzare le cellule mediante FACS.

L'anticorpo può modulare la segnalazione associata ad AXL in una cellula che esprime AXL quando la cellula è messa a contatto con l'anticorpo.

15 L'anticorpo può essere uno che non modula la segnalazione associata ad AXL in una cellula che esprime AXL quando la cellula è messa a contatto con l'anticorpo.

Esempi non limitativi di modulazione della segnalazione associata ad AXL includono la modulazione di vie di segnalazione intracellulare come le cascate di PI3K/AKT, proteina chinasi attivata da
20 mitogeno (MAPK), STAT e NF- κ B.

L'anticorpo anti-AXL o AXL-ADC può competere per il legame ad AXL con un anticorpo comprendente una regione pesante variabile (VH) e una regione leggera variabile (VL) selezionata dal gruppo
25 costituito da:



- (a) una regione VH comprendente SEQ ID No:1 e una regione VL comprendente SEQ ID No:2 [107];
- (b) una regione VH comprendente SEQ ID No:5 e una regione VL comprendente SEQ ID No:6 [148];
- 5 (c) una regione VH comprendente SEQ ID No:34 e una regione VL comprendente SEQ ID No:35 [733];
- (d) una regione VH comprendente SEQ ID No:7 e una regione VL comprendente SEQ ID No:9 [154];
- (e) una regione VH comprendente SEQ ID No:10 e una regione VL
10 comprendente SEQ ID No:11 [171];
- (f) una regione VH comprendente SEQ ID No:16 e una regione VL comprendente SEQ ID No:18 [183];
- (g) una regione VH comprendente SEQ ID No:25 e una regione VL comprendente SEQ ID No:26 [613];
- 15 (h) una regione VH comprendente SEQ ID No:31 e una regione VL comprendente SEQ ID No:33 [726];
- (i) una regione VH comprendente SEQ ID No:3 e una regione VL comprendente SEQ ID No:4 [140];
- (j) una regione VH comprendente SEQ ID No:8 e una regione VL
20 comprendente SEQ ID No:9 [154-M103L];
- (k) una regione VH comprendente SEQ ID No:12 e una regione VL comprendente SEQ ID No:13 [172];
- (l) una regione VH comprendente SEQ ID No:14 e una regione VL comprendente SEQ ID No:15 [181];
- 25 (m) una regione VH comprendente SEQ ID No:17 e una regione VL



comprendente SEQ ID No:18 [183-N52Q];

(n) una regione VH comprendente SEQ ID No:19 e una regione VL comprendente SEQ ID No:20 [187];

5 (o) una regione VH comprendente SEQ ID No:21 e una regione VL comprendente SEQ ID No:22 [608-01];

(p) una regione VH comprendente SEQ ID No:23 e una regione VL comprendente SEQ ID No:24 [610-01];

(q) una regione VH comprendente SEQ ID No:27 e una regione VL comprendente SEQ ID No:28 [613-08];

10 (r) una regione VH comprendente SEQ ID No:29 e una regione VL comprendente SEQ ID No:30 [620-06]; e

(s) una regione VH comprendente SEQ ID No:32 e una regione VL comprendente SEQ ID No:33 [726-M101L].

Quando usato qui nel contesto di un anticorpo e un ligando
15 Gas6 o nel contesto di due o più anticorpi, il termine “compete con” o
“compete in modo incrociato con” indica che l’anticorpo compete,
rispettivamente, con il ligando o con un altro anticorpo, ad es. un
anticorpo “di riferimento”, nel legarsi a un antigene. L’Esempio 2
descrive un esempio di come testare la competizione di un anticorpo
20 anti-AXL con il ligando di AXL Gas6. Gli anticorpi di riferimento preferiti
per la competizione incrociata tra due anticorpi sono quelli che
comprendono una regione di legame comprendente la regione VH e la
regione VL di un anticorpo qui denominati 107, 148, 733, 154, 171,
183, 613, 726, 140, 154-M103L, 172, 181, 183-N52Q, 187, 608-01,
25 610-01, 613-08, 620-06 o 726-M101L, come esposto nella Tabella 4. Un



anticorpo di riferimento particolarmente preferito è l'anticorpo denominato 107.

L'anticorpo anti-AXL può legarsi allo stesso epitopo su AXL come qualsiasi uno o più degli anticorpi secondo la forma di
5 realizzazione sopra menzionata, come definito dalle loro sequenze VH e VL, ad es. una regione VH comprendente SEQ ID No:1 e una regione VL comprendente SEQ ID No:2 [107].

I metodi per determinare un epitopo a cui si lega un anticorpo sono ben noti nel settore. Pertanto, l'esperto saprà come determinare un
10 tale epitopo. Tuttavia, un esempio del determinare se un anticorpo si lega all'interno di un epitopo qui descritto può essere quello di introdurre mutazioni puntiformi nel dominio extracellulare del dominio extracellulare di AXL, ad es. allo scopo di identificare gli amminoacidi coinvolti nel legame dell'anticorpo all'antigene. Rientra nella conoscenza
15 dell'esperto introdurre (una) mutazione/i puntiforme/i nel dominio extracellulare di AXL e testare il legame dell'anticorpo ai domini extracellulari di AXL mutati con mutazione/i puntiforme/i, poiché ci si aspetta che l'effetto di mutazioni puntiformi sulla struttura 3D complessiva sia minimo.

20 Un metodo alternativo è stato usato nell'Esempio 3, in cui la specificità dei domini di AXL è stata mappata preparando un pannello di mutanti di AXL chimerici umano-murino dove il dominio Ig1, Ig2, FN1 o FN2 umano era stato sostituito con il suo analogo murino, e determinando a quale mutante si legava un anticorpo anti-AXL. Questo
25 metodo era basato sul principio che questi anticorpi specifici per AXL



umano riconoscevano AXL umano ma non quello murino. Quindi, in forme di realizzazione separate e specifiche, l'anticorpo si lega al dominio Ig1 di AXL, al dominio Ig2 di AXL, al dominio FN1 di AXL o al dominio FN2 di AXL.

5 In questo esempio è stato anche usato un metodo di mappatura epitopica a risoluzione più elevata, che identifica gli amminoacidi dei domini extracellulari di AXL coinvolti nel legame di anticorpo. Nello specifico, questo metodo ha analizzato il legame dell'anticorpo anti-AXL a una libreria di varianti di sequenza di AXL
10 generate mediante ricombinazione delle sequenze di AXL derivate da specie con livelli variabili di omologia con la sequenza di AXL umano (SEQ ID No. 130) nel dominio extracellulare. Questo metodo era basato sul principio che questi anticorpi specifici per AXL umano riconoscono AXL umano, ma non l'AXL da qualsiasi altra specie usata nell'esempio.

15 L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio Ig1 di AXL, e il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da L121 a Q129 o uno o più o tutti da T112 a Q124 di AXL umano, in cui la numerazione dei residui amminoacidici si riferisce alle loro rispettive posizioni
20 nell'AXL umano (SEQ ID No. 130). L'anticorpo può a un epitopo all'interno del dominio Ig1 di AXL, e il legame dell'anticorpo può essere dipendente dagli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da L121 a Q129 o da T112 a Q124 di AXL umano. Il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli amminoacidi nella posizione
25 L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 e Q129,



corrispondenti agli amminoacidi coinvolti nel legame dell'anticorpo qui denominato 107. Il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli amminoacidi nella posizione T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 e Q124.

5 L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio Ig2 di AXL, e il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alla posizione D170 o alla combinazione di D179 o uno o più o tutti gli amminoacidi nelle posizioni da T182 a R190 di AXL umano. Il legame dell'anticorpo può
10 essere dipendente dagli amminoacidi nella posizione T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 e R190.

L'anticorpo può legarsi a un il dominio FN1 di AXL umano, e il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da Q272 a A287 e da G297 a
15 P301 di AXL umano. Il legame dell'anticorpo può essere dipendente dagli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da Q272 a A287 e da G297 a P301 di AXL umano.

L'anticorpo può legarsi al dominio FN2 di AXL umano e il legame dell'anticorpo può essere dipendente da uno o più o tutti gli
20 amminoacidi corrispondenti alle posizioni A359, R386 e da Q436 a K439 di AXL umano.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio Ig1 di AXL, e l'epitopo può comprendere o richiedere uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da L121 a Q129 o uno o più o
25 tutti da T112 a Q124 di AXL umano, in cui la numerazione dei residui



amminoacidici si riferisce alle loro rispettive posizioni nell'AXL umano (SEQ ID No. 130). In una forma di realizzazione, l'anticorpo si lega a un epitopo all'interno del dominio Ig1 di AXL, e l'epitopo comprende o richiede gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da L121 a Q129 o da T112 a Q124 di AXL umano. Preferibilmente, l'epitopo comprende uno o più o tutti gli amminoacidi nella posizione L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 e Q129, corrispondenti agli amminoacidi coinvolti nel legame dell'anticorpo qui denominato 107. L'epitopo può uno o più o tutti gli amminoacidi nella posizione T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 e Q124.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio Ig2 di AXL, e l'epitopo può comprendere o richiedere uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alla posizione D170 o alla combinazione di D179 o uno o più o tutti gli amminoacidi nelle posizioni da T182 a R190 di AXL umano. L'epitopo può comprendere o richiedere gli amminoacidi nella posizione T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 e R190.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio FN1 di AXL umano, il quale epitopo comprende o richiede uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da Q272 a A287 e da G297 a P301 di AXL umano. L'epitopo può comprendere o richiedere gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni da Q272 a A287 e da G297 a P301 di AXL umano.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio



GEN014ESM

FN2 di AXL umano, il quale epitopo comprende o richiede uno o più o tutti gli amminoacidi corrispondenti alle posizioni A359, R386 e da Q436 a K439 di AXL umano.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo all'interno del dominio di tipo FN1 di AXL umano.

L'anticorpo può legarsi a un epitopo su AXL, il quale epitopo è riconosciuto da uno qualsiasi degli anticorpi definiti da

a)) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107],

b) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148],

c) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733],

d) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 53, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154],

e) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente; e una regione VL



GEN014ESM

comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154-M103L],

f) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente; e una regione VL
5 comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171],

g) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente; e una regione VL
10 comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172],

h) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente; e una regione VL
comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181],

15 i) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente; e una regione VL
comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente, [183],

j) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
20 CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente; e una regione VL
comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q],

k) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
25 CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente; e una regione VL
comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS



e 82, rispettivamente, [187],

l) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, 5 GAS e 87, rispettivamente, [608-01],

m) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente, [610-01],

10 n) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613],

o) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e 15 CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 10, DAS e 102, rispettivamente, [613-08],

p) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente; e una regione VL 20 comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente, [620-06],

q) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, 25 AAS e 113, rispettivamente, [726],



r) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L],

5 s) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [140],

t) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
10 CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 128, XAS, in cui X è D o G, e 129, rispettivamente [613/613-08],

u) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 119 e 120, rispettivamente, e una regione VL
15 comprendente sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS, e 50, rispettivamente, [148/140],

v) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 123, 124 e 125, rispettivamente, e una regione VL
20 comprendente sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171/172/181], e

w) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 121, 109 e 122, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS, e 113, rispettivamente [726/187], e

25 x) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



CDR3 di SEQ ID No.: 93, 126 e 127, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente [613/608-01/610-01/620-06].

L'anticorpo può legarsi a un epitopo su AXL, il quale epitopo è
5 riconosciuto da uno qualsiasi degli anticorpi definiti dal comprendere una regione di legame comprendente le regioni VH e VL di un anticorpo selezionato da quelli qui denominati 107, 061, 137, 148, 154-M103L, 171, 183-N52Q, 511, 613, 726-M102L e 733. Come mostrato nell'Esempio 16, questi anticorpi anti-AXL internalizzano, e sono
10 pertanto adatti a un approccio mediante ADC.

L'anticorpo può comprendere almeno una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da:

- (a) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
15 CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107];
- (b) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
20 CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148];
- (c) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
25 CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente [733];



- (d) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 53, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154];
- 5 (e) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154-M103L];
- (f) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
10 CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171];
- (g) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
15 CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172];
- (h) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
20 CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181];
- (i) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
CDR3 di SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente, e una regione
VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID
No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183];
- 25 (j) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q];

(k) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS e 82, rispettivamente, [187];

(l) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, GAS e 87, rispettivamente [608-01];

(m) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente [610-01];

(n) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613];

(o) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 101, DAS e 102, rispettivamente [613-08];

(p) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente, e una



regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente [620-06];

(q) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente, e una

5 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente, [726];

(r) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente, e una

10 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L];

(s) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente, e una regione

VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [140];

15 (t) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente, e una regione

VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 128, XAS, in cui X è D o G, e 129, rispettivamente [613/613-

08];

20 (u) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 119 e 120, rispettivamente, e una

regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente [148/140];

(v) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e

25 CDR3 di SEQ ID No.: 123, 124 e 125, rispettivamente, e una



regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente [171/172/181]; e

(w) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 121, 109 e 122, rispettivamente, e una

5 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726/187]; e

(x) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 93, 126 e 127, rispettivamente, e una

10 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente [613/608-01/610-01/620-06];

L'anticorpo può comprendere almeno una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da:

15 (a) una regione VH comprendente SEQ ID No:1 e una regione VL comprendente SEQ ID No:2 [107];

(b) una regione VH comprendente SEQ ID No:5 e una regione VL comprendente SEQ ID No:6 [148];

20 (c) una regione VH comprendente SEQ ID No:34 e una regione VL comprendente SEQ ID No:35 [733];

(d) una regione VH comprendente SEQ ID No:7 e una regione VL comprendente SEQ ID No:9 [154];

(e) una regione VH comprendente SEQ ID No:10 e una regione VL comprendente SEQ ID No:11 [171];

25 (f) una regione VH comprendente SEQ ID No:16 e una regione VL



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



(s) una regione VH comprendente SEQ ID No:32 e una regione VL comprendente SEQ ID No:33 [726-M101L];

La presente divulgazione fornisce anche anticorpi che comprendono varianti funzionali della regione VL, della regione VH o di una o più CDR degli anticorpi sopra menzionati. Una variante funzionale di una VL, VH o CDR usata nel contesto di un anticorpo contro AXL consente ancora all'anticorpo di conservare almeno una proporzione sostanziale (almeno circa 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o più) dell'affinità/avidità e/o della specificità/selettività dell'anticorpo parentale e in alcuni casi un tale anticorpo contro AXL può essere associato a maggiore affinità, selettività e/o specificità in confronto all'anticorpo parentale.

Tali varianti funzionali conservano tipicamente una significativa identità di sequenza all'anticorpo parentale. La percentuale di identità tra due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze (ossia % di omologia = # di posizioni identiche/# totale di posizioni x 100), tenendo in considerazione il numero di spazi ("gap"), e la lunghezza di ciascun gap, che è necessario introdurre per un allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto delle sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere compiuti usando un algoritmo matematico, che è ben noto nel settore.

L'identità di sequenza tra due sequenze amminoacidiche può, ad esempio, essere determinata usando l'algoritmo di Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)



come implementato nel programma Needle del pacchetto EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferibilmente versione 5.0.0 or successiva. I parametri usati sono penalità per apertura di gap di 10,
5 penalità per estensione di gap di 0,5, e la matrice di sostituzione EBLOSUM62 (versione EMBOSS di BLOSUM62). L'uscita di Needle chiamata l'"identità più lunga" (ottenuta usando l'opzione "-nobrief") è usata come la percentuale di identità ed è calcolata come segue:

$(\text{Residui identici} \times 100) / (\text{Lunghezza dell'allineamento} -$
10 $\text{Numero totale di gap nell'allineamento}).$

Le sequenze VH, VL e/o CDR di varianti possono differire da quelle delle sequenze dell'anticorpo parentale per via principalmente di sostituzioni conservative; ad esempio almeno circa 35%, circa 50% o più, circa 60% o più, circa 70% o più, circa 75% o più, circa 80% o più,
15 circa 85% o più, circa 90% o più, (ad es., circa 65-95%, come circa 92%, 93% o 94%) delle sostituzioni nella variante sono sostituzioni conservative di residuo/i amminoacidico/i.

Le sequenze VH, VL e/o CDR di varianti possono differire da quelle delle sequenze dell'anticorpo parentale per via principalmente di
20 sostituzioni conservative; ad esempio 10 o meno, come 9 o meno, 8 o meno, 7 o meno, 6 o meno, 5 o meno, 4 o meno, 3 o meno, 2 o meno o 1 delle sostituzioni nella variante sono sostituzioni conservative di residuo/i amminoacidico/i.

Sono anche fornite forme di realizzazione della presente
25 divulgazione in cui nelle tre sequenze CDR nella catena pesante



variabile e/o nella catena leggera variabile della forma di realizzazione precedente sono consentite mutazioni o sostituzioni di fino a cinque mutazioni o sostituzioni. Le fino a cinque mutazioni o sostituzioni possono essere distribuite nelle tre sequenze CDR della catena pesante variabile e nelle tre sequenze CDR della catena leggera variabile. Le fino a cinque mutazioni o sostituzioni possono essere distribuite nelle sei sequenze CDR della regione di legame. Le mutazioni o sostituzioni possono essere di amminoacidi conservativi, fisici o funzionali in modo tale che le mutazioni o sostituzioni non cambino l'epitopo o preferibilmente non modifichino l'affinità di legame all'epitopo di più del 30 %, come di più del 20 % o come di più del 10%. Gli amminoacidi conservativi, fisici o funzionali sono selezionati tra i 20 amminoacidi naturali trovati ossia Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr e Val.

15 Quindi l'anticorpo può comprendere almeno una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da sequenze VH e VL identiche almeno al 90%, come almeno al 95%, come almeno al 97%, come almeno al 99% a:

- (a) una regione VH comprendente SEQ ID No:1 e una regione VL comprendente SEQ ID No:2 [107];
- (b) una regione VH comprendente SEQ ID No:5 e una regione VL comprendente SEQ ID No:6 [148];
- (c) una regione VH comprendente SEQ ID No:34 e una regione VL comprendente SEQ ID No:35 [733];
- 25 (d) una regione VH comprendente SEQ ID No:7 e una regione VL



- comprendente SEQ ID No:9 [154];
- (e) una regione VH comprendente SEQ ID No:10 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:11 [171];
- (f) una regione VH comprendente SEQ ID No:16 e una regione VL
5 comprendente SEQ ID No:18 [183];
- (g) una regione VH comprendente SEQ ID No:25 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:26 [613];
- (h) una regione VH comprendente SEQ ID No:31 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:33 [726];
- 10 (i) una regione VH comprendente SEQ ID No:3 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:4 [140];
- (j) una regione VH comprendente SEQ ID No:8 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:9 [154-M103L];
- (k) una regione VH comprendente SEQ ID No:12 e una regione VL
15 comprendente SEQ ID No:13 [172];
- (l) una regione VH comprendente SEQ ID No:14 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:15 [181];
- (m) una regione VH comprendente SEQ ID No:17 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:18 [183-N52Q];
- 20 (n) una regione VH comprendente SEQ ID No:19 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:20 [187];
- (o) una regione VH comprendente SEQ ID No:21 e una regione VL
comprendente SEQ ID No:22 [608-01];
- (p) una regione VH comprendente SEQ ID No:23 e una regione VL
25 comprendente SEQ ID No:24 [610-01];



- (q) una regione VH comprendente SEQ ID No:27 e una regione VL comprendente SEQ ID No:28 [613-08];
- (r) una regione VH comprendente SEQ ID No:29 e una regione VL comprendente SEQ ID No:30 [620-06]; e
- 5 (s) una regione VH comprendente SEQ ID No:32 e una regione VL comprendente SEQ ID No:33 [726-M101L].

La presente divulgazione fornisce anche anticorpi che comprendono varianti funzionali della regione VL, della regione VH o di una o più CDR degli anticorpi degli esempi. Una variante funzionale di una VL, VH o CDR usata nel contesto di un anticorpo contro AXL consente ancora all'anticorpo di conservare almeno una proporzione sostanziale (almeno circa 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o più) dell'affinità/avidità e/o della specificità/selettività dell'anticorpo parentale e in alcuni casi un tale anticorpo contro AXL può essere associato a maggiore affinità, selettività e/o specificità in confronto all'anticorpo parentale.

Tali varianti funzionali conservano tipicamente una significativa identità di sequenza all'anticorpo parentale. La percentuale di identità tra due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze (ossia % di omologia = # di posizioni identiche/# totale di posizioni x 100), tenendo in considerazione il numero di gap, e la lunghezza di ciascun gap, che è necessario introdurre per un allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto delle sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere compiuti usando un algoritmo matematico,



che è ben noto nel settore.

Le sequenze VH, VL e/o CDR di varianti possono differire da quelle delle sequenze dell'anticorpo parentale per via principalmente di sostituzioni conservative; ad esempio almeno circa 35%, circa 50% o
5 più, circa 60% o più, circa 70% o più, circa 75% o più, circa 80% o più, circa 85% o più, circa 90% o più, (ad es., circa 65-95%, come circa 92%, 93% o 94%) delle sostituzioni nella variante sono sostituzioni conservative di residuo/i amminoacidico/i.

Le sequenze VH, VL e/o CDR di varianti possono differire da
10 quelle delle sequenze dell'anticorpo parentale per via principalmente di sostituzioni conservative: ad esempio 10 o meno, come 9 o meno, 8 o meno, 7 o meno, 6 o meno, 5 o meno, 4 o meno, 3 o meno, 2 o meno o 1 delle sostituzioni nella variante sono sostituzioni conservative di residuo/i amminoacidico/i.

15 Sono anche fornite forme di realizzazione della presente divulgazione in cui nelle tre sequenze CDR nella catena pesante variabile e/o nella catena leggera variabile della forma di realizzazione precedente sono consentite mutazioni o sostituzioni di fino a cinque mutazioni o sostituzioni. Le fino a cinque mutazioni o sostituzioni
20 possono essere distribuite nelle tre sequenze CDR della catena pesante variabile e nelle tre sequenze CDR della catena leggera variabile. Le fino a cinque mutazioni o sostituzioni possono essere distribuite nelle sei sequenze CDR della regione di legame. Le mutazioni o sostituzioni possono essere di amminoacidi conservativi, fisici o funzionali in modo
25 tale che le mutazioni o sostituzioni non cambino l'epitopo o



preferibilmente non modificano l'affinità di legame all'epitopo di più del 30 %, come di più del 20 % o come di più del 10%. Gli amminoacidi conservativi, fisici o funzionali sono selezionati tra i 20 amminoacidi naturali trovati ossia Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr e Val.

L'anticorpo può comprendere almeno una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da sequenze VH e VL identiche almeno al 90%, come almeno al 95%, come almeno al 97%, come almeno al 99% a:

- 10 (t) una regione VH comprendente SEQ ID No:1 e una regione VL comprendente SEQ ID No:2 [107];
- (u) una regione VH comprendente SEQ ID No:5 e una regione VL comprendente SEQ ID No:6 [148];
- (v) una regione VH comprendente SEQ ID No:34 e una regione VL
15 comprendente SEQ ID No:35 [733];
- (w) una regione VH comprendente SEQ ID No:7 e una regione VL comprendente SEQ ID No:9 [154];
- (x) una regione VH comprendente SEQ ID No:10 e una regione VL comprendente SEQ ID No:11 [171];
- 20 (y) una regione VH comprendente SEQ ID No:16 e una regione VL comprendente SEQ ID No:18 [183];
- (z) una regione VH comprendente SEQ ID No:25 e una regione VL comprendente SEQ ID No:26 [613];
- (aa) una regione VH comprendente SEQ ID No:31 e una regione VL
25 comprendente SEQ ID No:33 [726];



- (bb) una regione VH comprendente SEQ ID No:3 e una regione VL comprendente SEQ ID No:4 [140];
- (cc) una regione VH comprendente SEQ ID No:8 e una regione VL comprendente SEQ ID No:9 [154-M103L];
- 5 (dd) una regione VH comprendente SEQ ID No:12 e una regione VL comprendente SEQ ID No:13 [172];
- (ee) una regione VH comprendente SEQ ID No:14 e una regione VL comprendente SEQ ID No:15 [181];
- (ff) una regione VH comprendente SEQ ID No:17 e una regione VL
10 comprendente SEQ ID No:18 [183-N52Q];
- (gg) una regione VH comprendente SEQ ID No:19 e una regione VL comprendente SEQ ID No:20 [187];
- (hh) una regione VH comprendente SEQ ID No:21 e una regione VL comprendente SEQ ID No:22 [608-01];
- 15 (ii) una regione VH comprendente SEQ ID No:23 e una regione VL comprendente SEQ ID No:24 [610-01];
- (jj) una regione VH comprendente SEQ ID No:27 e una regione VL comprendente SEQ ID No:28 [613-08];
- (kk) una regione VH comprendente SEQ ID No:29 e una regione VL
20 comprendente SEQ ID No:30 [620-06]; e
- (ll) una regione VH comprendente SEQ ID No:32 e una regione VL comprendente SEQ ID No:33 [726-M101L].

L'anticorpo può comprendere almeno una regione di legame comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di VH e VL di un
25 anticorpo anti-AXL noto nel settore, ad es. un anticorpo descritto in uno



qualsiasi tra Leconet *et al.* (2013), Li *et al.* (2009), Ye *et al.* (2010), Iida
et al. (2014), WO 2012/175691 (INSERM), WO 2012/175692 (INSERM),
WO 2013/064685 (Pierre Fabré Medicaments), WO 2013/090776
(INSERM), WO 2009/063965 (Chugai Pharmaceuticals), WO
5 2010/131733, WO 2011/159980 (Genentech), WO09062690 (U3
Pharma), WO2010130751 (U3 Pharma), WO2014093707 (Stanford
University) ed EP2228392A1 (Chugai). L'anticorpo può essere
l'anticorpo murino 1613F12 o una sua variante chimerica o una
umanizzata come descritto in WO2014174111 (Pierre Fabré
10 Medicament), in cui le sequenze VH e VL dell'anticorpo murino 1613F12
sono presentate come SEQ ID:8 e SEQ ID:7, rispettivamente. La
sequenza VH della variante di anticorpo umanizzata di 1613F12 è
selezionata tra le sequenze ivi divulgate come SEQ ID No. da 29 a 49 e
SEQ ID No. 82, e la sequenza VL della variante di anticorpo umanizzata
15 di 1613F12 è selezionata tra le sequenze ivi divulgate come SEQ ID No.
da 17 a 28 e SEQ ID No. 81. Un anticorpo specifico comprende le
sequenze VH e VL ivi divulgate come SEQ ID No. 29 e 17,
rispettivamente. Le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di VH di 1613F12
murino, chimerico e umanizzato sono rispettivamente SEQ ID No. 4, 5 e
20 6, e le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di VL di 1613F12 murino,
umanizzato sono ivi divulgate come, rispettivamente, SEQ ID No. 1, 2 e
3. L'anticorpo può essere un anticorpo descritto in WO2011159980
(Hoffman-La Roche), in particolare i paragrafi da [0127] fino a [0229]
(pagine 28-52). Ad esempio, l'anticorpo può comprendere le regioni
25 ipervariabili (HVR) di VH e VL, o le regioni VH e VL, dell'anticorpo



YW327.6S2, che sono ivi divulgate come SEQ ID No. 7, 8 e 9 (rispettivamente HVR1, 2 e 3 di VH), SEQ ID No. 10, 11 e 12 (rispettivamente HVR1, 2 e 3 di VL) e SEQ ID No. 103 e 104 (rispettivamente le sequenze VH e VL).

5 L'anticorpo può mediare il raggruppamento ("clustering") o la reticolazione mediato/a da anticorpo (ossia dovuto/a alla regione Fc di anticorpi legati ad AXL che si lega alle cellule che esprimono FcR) di molecole di AXL sulla superficie di una cellula, il che può portare all'apoptosi della cellula.

10 L'anticorpo può indurre una risposta cellulare dipendente da Fc come ADCC o ADCP contro una cellula che esprime AXL dopo il legame dell'anticorpo specifico per AXL alla membrana plasmatica della cellula che esprime AXL in presenza di cellule effettrici. La frazione anticorpo dell'anticorpo è tipicamente di lunghezza intera e di un isotipo
15 che porta a una risposta di ADCC o ADCP, come, ad es., un isotipo IgG1, κ .

L'anticorpo può indurre una risposta di CDC contro una cellula che esprime AXL dopo il legame dell'anticorpo specifico per AXL alla membrana plasmatica della cellula che esprime AXL in presenza di
20 proteine del complemento, come proteine del complemento presenti nel normale siero umano, che possono essere attivate. L'anticorpo è tipicamente di lunghezza intera e di un isotipo in grado di indurre l'attivazione del sistema del complemento, come, ad es., un isotipo
IgG1, κ

25 L'anticorpo e/o ADC può inoltre essere caratterizzato



dall'internalizzazione in seguito al legame ad AXL. Di conseguenza, l'anticorpo e/o ADC può essere internalizzato e trafficato verso i lisosomi per scissione proteolitica specifica (ossia linker scindibile) o non specifica (linker non scindibile) del complesso anticorpo anti-AXL-
5 linker-farmaco.

L'anticorpo può interferire con la regolazione mediata da AXL della risposta immunitaria innata o adattativa, come mediante il legame dell'anticorpo alle cellule NK, cellule dendritiche o macrofagi che esprimono AXL.

10 La porzione terapeutica dell'ADC può essere collegata alla porzione anticorpo mediante un linker che consente il rilascio del farmaco quando l'ADC è internalizzato, ad es. mediante un cambiamento di pH o di condizioni riducenti. La tecnologia di linker adatta è nota nel settore, come qui descritto.

15 In una forma della realizzazione, l'anticorpo comprende una catena pesante di un isotipo selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. In un'ulteriore forma della realizzazione, l'anticorpo comprende una catena pesante di un isotipo selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 umane.

20 Il termine "isotipo" come usato qui si riferisce alla classe delle immunoglobuline (ad esempio IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM) o qualsiasi altro loro allotipo, come IgG1m(za) e IgG1m(f) che è codificato da geni di regione costante di catena pesante. Inoltre, ciascun isotipo di catena pesante può essere combinato con una catena leggera
25 kappa (κ) o lambda (λ).



In una forma di realizzazione, l'isotipo è IgG1, come IgG1 umana, facoltativamente l'allotipo IgG1m(f).

In una forma di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo monoclonale di lunghezza intera, facoltativamente un anticorpo IgG1,
5 monoclonale umano di lunghezza intera.

Il termine "anticorpo di lunghezza intera" quando usato qui si riferisce a un anticorpo (ad es. un anticorpo parentale o variante) che contiene tutti i domini costanti e variabili delle catene pesanti e leggere corrispondenti a quelli che si trovano normalmente in un anticorpo
10 selvatico di quell'isotipo. Un anticorpo di lunghezza intera secondo la presente invenzione può essere prodotto mediante un metodo comprendente le fasi di (i) clonare le sequenze CDR in un vettore adeguato comprendente le sequenze complete di catena pesante e la sequenza completa di catena leggera, e (ii) esprimere le sequenze
15 complete di catena pesante e catena leggera in sistemi di espressione adeguati. Rientra nella conoscenza dell'esperto produrre un anticorpo di lunghezza intera quando si inizia da sequenze CDR o da sequenze di regioni variabili intere. Pertanto, l'esperto saprà come generare un anticorpo di lunghezza intera secondo la presente invenzione.

20 L'anticorpo può essere un anticorpo umano.

Il termine "anticorpo umano", come usato qui, intende includere anticorpi aventi regioni variabili e di "framework" derivate da sequenze di immunoglobulina di linea germinale umana e un dominio costante di immunoglobulina umana. Gli anticorpi umani della
25 divulgazione possono includere residui amminoacidici non codificati da



sequenze di immunoglobulina di linea germinale umana (ad es. mutazioni, inserimenti o delezioni introdotte mediante mutagenesi casuale o sito-specifica *in vitro* o mediante mutazione somatica *in vivo*). Tuttavia, il termine “anticorpo umano”, come usato qui, non intende
5 includere anticorpi in cui le sequenze CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie non umana, come un topo, sono state innestate su sequenze di “framework” umane.

Come usato qui, un anticorpo umano è “derivato da” una particolare sequenza di linea germinale se l'anticorpo è ottenuto da un
10 sistema che usa sequenze di immunoglobulina umana, ad esempio immunizzando un topo transgenico recante geni di immunoglobulina umana o vagliando una libreria di geni di immunoglobulina umana, e in cui l'anticorpo umano selezionato è almeno al 90%, come almeno al 95%, ad esempio almeno al 96%, come almeno al 97%, ad esempio
15 almeno al 98%, o come almeno al 99% identico in sequenza amminoacidica alla sequenza amminoacidica codificata dal gene di immunoglobulina di linea germinale. Tipicamente, fuori dalla CDR3 di catena pesante, un anticorpo umano derivato da una particolare sequenza di linea germinale umana presenterà non più di 20 differenze
20 amminoacidiche, ad es. non più di 10 differenze amminoacidiche, come non più di 9, 8, 7, 6 o 5, ad esempio non più di 4, 3, 2, o 1 sequenza amminoacidica dalla sequenza amminoacidica codificata dal gene di immunoglobulina di linea germinale.

L'anticorpo secondo la presente divulgazione può comprendere
25 modificazioni amminoacidiche nelle catene pesanti e/o leggere di



immunoglobulina. In particolare, gli amminoacidi nella regione Fc dell'anticorpo possono essere modificati.

Il termine "regione Fc" come usato qui si riferisce a una regione comprendente, nella direzione dall'estremità N- a quella C-terminale dell'anticorpo, almeno una regione di cerniera, una regione CH2 e una regione CH3. Una regione Fc dell'anticorpo può mediare il legame dell'immunoglobulina a fattori o tessuti ospiti, incluse varie cellule del sistema immunitario (come le cellule effettrici) e componenti del sistema del complemento.

Il termine "regione di cerniera" come usato qui si riferisce alla regione di cerniera di una catena pesante di immunoglobulina. Pertanto, ad esempio, la regione di cerniera di un anticorpo IgG1 umano corrisponde agli amminoacidi 216-230 secondo la numerazione Eu come esposto in Kabat *et al.* (1991). Tuttavia, la regione di cerniera può anche essere qualsiasi degli altri sottotipi come qui descritto.

Il termine "regione CH1" o "dominio CH1" come usato qui si riferisce alla regione CH1 di una catena pesante di immunoglobulina. Pertanto, ad esempio, la regione CH1 di un anticorpo IgG1 umano corrisponde agli amminoacidi 118-215 secondo la numerazione Eu come esposto in Kabat *et al.* (1991). Tuttavia, la regione CH1 può anche essere qualsiasi degli altri sottotipi come qui descritto.

Il termine "regione CH2" "o dominio CH2" come usato qui si riferisce alla regione CH2 di una catena pesante di immunoglobulina. Pertanto, ad esempio, la regione CH2 di un anticorpo IgG1 umano corrisponde agli amminoacidi 231-340 secondo la numerazione Eu



come esposto in Kabat *et al.* (1991). Tuttavia, la regione CH2 può anche essere qualsiasi degli altri sottotipi come qui descritto.

Il termine “regione CH3” “o dominio CH3” come usato qui si riferisce alla regione CH3 di una catena pesante di immunoglobulina.
5 Pertanto, ad esempio, la regione CH3 di un anticorpo IgG1 umano corrisponde agli amminoacidi 341-447 secondo la numerazione Eu come esposto in Kabat *et al.* (1991). Tuttavia, la regione CH3 può anche essere qualsiasi degli altri sottotipi come qui descritto.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo
10 carente di funzione effettrice, un anticorpo IgG4 stabilizzato o un anticorpo monovalente.

In una particolare forma di realizzazione, la catena pesante è stata modificata in modo tale che l'intera regione di cerniera è stata cancellata.

15 La sequenza dell'anticorpo può essere stata modificata in modo tale che esso non comprende siti accettori per glicosilazione legata all'N.

L'anticorpo può essere un anticorpo a catena singola.

La presente divulgazione riguarda inoltre un anticorpo
20 multispecifico comprendente almeno una prima regione di legame di un anticorpo secondo un qualsiasi aspetto o rivendicazione qui descritti, e una seconda regione di legame che si lega a un bersaglio o epitopo diverso rispetto alla prima regione di legame. Il termine “anticorpo multispecifico” come usato qui si riferisce ad anticorpi in cui le regioni
25 di legame si legano ad almeno due, come almeno tre, antigeni diversi o



ad almeno due, come almeno tre, diversi epitopi diversi sullo stesso antigene.

La presente divulgazione riguarda l'uso di un ADC comprendente un anticorpo bispecifico comprendente una prima
5 regione di legame di un anticorpo secondo un qualsiasi aspetto o rivendicazioni qui descritti, e una seconda regione di legame che si lega a un bersaglio o epitopo diverso rispetto alla prima regione di legame.

Il termine "bispecifico" come usato qui si riferisce a molecole che si legano, come anticorpi in cui le regioni di legame della molecola
10 che si lega si legano a due antigeni diversi o a due epitopi diversi sullo stesso epitopo.

Il termine "anticorpo bispecifico" si riferisce a un anticorpo avente specificità per almeno due epitopi diversi, tipicamente non sovrapposti. Tali epitopi possono essere sullo stesso bersaglio o su
15 bersagli diversi. Se gli epitopi sono su bersagli diversi, tali bersagli possono essere sulla stessa cellula o su cellule, tipi di cellule o strutture diverse/i, come tessuto extracellulare.

Il termine "bersaglio diverso" come usato qui si riferisce a un'altra proteina, molecola o simile diversa da AXL o da frammento di
20 AXL.

Esempi di molecole di anticorpo bispecifico che possono essere usate nella presente invenzione comprendono (i) un singolo anticorpo che ha due bracci comprendenti diverse regioni leganti l'antigene, (ii) un anticorpo a catena singola che ha specificità verso due epitopi diversi,
25 ad es. mediante due scFv collegati in tandem mediante un linker



peptidico aggiuntivo; (iii), un anticorpo a duplice dominio variabile (“dual-variable-domain antibody”, DVD-IgTM), in cui ciascuna catena leggera e catena pesante contiene due domini variabili in tandem attraverso un corto collegamento peptidico (Wu *et al.*, 2010); (iv) un
5 frammento (Fab)² bispecifico legato chimicamente; (v) un Tandab®, che è una fusione di due “diabody” a catena singola che porta a un anticorpo bispecifico tetravalente che ha due siti di legame per ciascuno degli antigeni bersaglio; (vi) un “flexibody”, che è una combinazione di scFv con un “diabody” risultando in una molecola multivalente; (vii) una
10 cosiddetta molecola “dock and lock” (Dock-and-Lock®), basata sul “dominio di dimerizzazione e attracco” nella Protein-chinasi A, che, quando applicata a Fab, può dare una proteina di legame specifica trivalente costituita da due frammenti Fab identici collegati a un diverso frammento Fab; (viii) una cosiddetta “molecola Scorpion”,
15 comprendente, ad es., due scFv fusi a entrambi i terminali di un braccio Fab umano; e (ix) un “diabody”.

L’anticorpo bispecifico della presente divulgazione può essere un “diabody”, un “cross-body”, come CrossMab, o un anticorpo bispecifico ottenuto mediante uno scambio controllato di braccio Fab
20 (come descritto in WO 2011/131746, Genmab A/S).

Esempi di classi diverse di anticorpi bispecifici includono ma non sono limitati a (i) molecole di tipo IgG con domini CH3 complementari per forzare l’eterodimerizzazione; (ii) molecole di duplice bersagliamento (“dual targeting”) di tipo IgG ricombinanti, in cui i due
25 lati della molecola contengono ciascuno il frammento Fab o parte del



frammento Fab di almeno due anticorpi diversi; (iii) molecole di fusione di IgG, in cui gli anticorpi IgG di lunghezza intera sono fusi al frammento Fab aggiuntivo o parti del frammento Fab; (iv) molecole di fusione di Fc, in cui molecole di Fv a catena singola o “diabody” stabilizzati sono fusi a domini costanti di catena pesante, a regioni Fc o a loro parti; (v) molecole di fusione di Fab, in cui i diversi frammenti Fab sono fusi insieme, fusi a domini costanti di catena pesante, a regioni Fc o a loro parti; e (vi) anticorpi basati su ScFv e su “diabody” e a catena pesante (ad es. “domain antibody”, Nanobodies®) in cui molecole Fv a catena singola diverse o “diabody” diversi o anticorpi a catena pesante diversi (ad es. “domain antibody”, Nanobodies®) sono fusi l’uno all’altro o a un’altra proteina o molecola di veicolo fusa a domini costanti di catena pesante, regioni di Fc o loro parti.

Esempi di molecole di tipo IgG con molecole con domini CH3 complementari includono ma non sono limitati a Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO/2002/020039), “Knobs-into-Holes” (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), molecole eterodimeriche con Fc abbinate elettrostaticamente (Amgen, EP1870459 e WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body, PIG-body e TIG-body (Pharmabcine), “Strand Exchange Engineered Domain body” (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), IgG1 e IgG2 bispecifiche (Pfizer/Rinat, WO11143545), “Azymetric scaffold” (Zymeworks/Merck, WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), XmAb (Xencor), anticorpi bispecifici bivalenti



(Roche, WO2009/080254), IgG bispecifica (Eli Lilly), molecole DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746), DuetMab (Medimmune, US2014/0348839), Biclomics (Merus, WO 2013/157953), NovImmune (κλBodies, WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/151792),
5 (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticorpi “Two-in-one” o “Dual Action Fab” (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), “Dual Variable Domain (DVD)-Ig™” (Abbott, US 7,612,18), “dual domain double head
10 antibodies” (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusioni di scFv (Genentech/Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246), TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530), fusioni ScFv/Fc, SCORPION
15 (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergent), “Dual Affinity Retargeting Technology” (Fc-DART™) (MacroGenics, WO2008/157379, WO2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diabody (Imclone/Eli Lilly) e mAb reticolati chimicamente (Karmanos Cancer Center), e mAb fusi covalentemente (AIMM therapeutics).

20 Esempli di molecole di duplice bersagliamento di tipo IgG ricombinanti includono ma non sono limitate a “Dual Targeting (DT)-Ig” (GSK/Domantis), anticorpo “Two-in-one” (Genentech), Mab reticolati (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), approcci con catena leggera comune (Crucell/Merus, US
25 7,262,028), “κλBodies” (NovImmune) e “CovX-body” (CovX/Pfizer).



Esempi di molecole di fusione di IgG includono ma non sono limitati a “Dual Variable Domain (DVD)-IgTM” (Abbott, US 7,612,181), “Dual domain double head antibodies” (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Bispecifici di tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab
5 (MedImmune/AZ) e BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US 7,951,918), fusioni di scFv (Novartis), fusioni di scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) e TvAb (Roche, WO2012025525,WO2012025530).

Esempi di molecole di fusione di Fc includono ma non sono
10 limitati a fusioni ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), “Dual Affinity Retargeting Technology” (Fc-DARTTM) (MacroGenics, WO2008157379 e WO2010080538) e “Dual(ScFv)2-Fab” (National Research Center for Antibody Medicine – Cina).

15 Esempi di anticorpi bispecifici di fusione di Fab includono ma non sono limitati a F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), “Dual-Action Fab” o “Bis-Fab” (Genentech), Dock-and-Lock[®] (DNL) (ImmunoMedics), bispecifici bivalenti (Biotecnol) e Fab-Fv (UCB-Celltech).

Esempi di anticorpi a base di ScFv, di “diabody” e “domain
20 antibody” includono ma non sono limitati a “Bispecific T Cell Engager” (BiTE[®]) (Micromet, Tandem Diabody (TandabTM) (Affimed), “Dual Affinity Retargeting Technology” (DART) (MacroGenics), “diabody” a catena singola (Academic), anticorpi di tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), fusione di ScFv di albumina di siero umano (Merrimack) e COMBODY (Epigen
25 Biotech), “dual targeting nanobodies[®]” (Ablynx), “domain antibody” a



sola catena pesante di duplice bersagliamento.

Un anticorpo bispecifico per l'uso come un ADC secondo la presente divulgazione può essere generato introducendo modificazioni nella regione costante dell'anticorpo.

5 L'anticorpo bispecifico può comprendere una prima e una seconda catena pesante, ciascuna delle catene pesante e leggera comprende almeno una regione di cerniera, una regione CH2 e CH3, in cui nella prima catena pesante almeno uno degli amminoacidi nelle posizioni corrispondenti alle posizioni selezionate dal gruppo costituito
10 da K409, T366, L368, K370, D399, F405, e Y407 in una catena pesante di IgG1 umana è stato sostituito, e nella seconda catena pesante almeno uno degli amminoacidi nelle posizioni corrispondenti a una posizione selezionata dal gruppo costituito da F405, T366, L368, K370, D399, Y407, e K409 in una catena pesante di IgG1 umana è stato
15 sostituito, e in cui la prima e la seconda catena pesante non sono sostituite nelle stesse posizioni.

L'anticorpo può essere uno in cui nella prima catena pesante l'amminoacido nella posizione corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana non è K, L o M e facoltativamente
20 l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in una catena pesante di IgG1 umana è F, e nella seconda catena pesante l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in una catena pesante di IgG1 umana non è F e l'amminoacido nella posizione corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana è K.

25 L'anticorpo può essere uno in cui nella prima catena pesante



l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in una catena pesante di IgG1 umana non è F, R, e G e nella seconda catena pesante gli amminoacidi nelle posizioni corrispondenti a una posizione selezionata dal gruppo costituito da T366, L368, K370, D399, Y407 e
5 K409 in una catena pesante di IgG1 umana è stato sostituito.

L'anticorpo può essere uno in cui l'amminoacido nella posizione corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana è diverso da K, L o M nella prima catena pesante, e nella seconda catena pesante l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in
10 una catena pesante di IgG1 umana non è F e facoltativamente l'amminoacido nella posizione corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana è K.

L'anticorpo può essere uno in cui l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in una catena pesante di IgG1 umana è L in detta prima catena pesante, e l'amminoacido nella posizione
15 corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana è R in detta seconda catena pesante, o viceversa.

Pertanto, l'amminoacido nella posizione corrispondente a K409 in una catena pesante di IgG1 umana può essere R nella prima
20 catena pesante, e l'amminoacido nella posizione corrispondente a F405 in una catena pesante di IgG1 umana può essere L nella seconda catena pesante.

A meno che non sia affermato diversamente o che non sia in contraddizione con il contesto, gli amminoacidi delle sequenze di
25 regione costante sono qui numerati secondo l'indice Eu di numerazione



(descritta in Kabat, 1991). I termini “indice Eu di numerazione” e “numerazione Eu come esposto in Kabat” possono essere usati in modo intercambiabile e hanno lo stesso significato e scopo. Pertanto, un amminoacido o un segmento in una sequenza che “corrisponde a” un amminoacido o un segmento in un’altra sequenza è uno che si allinea con l’altro amminoacido o segmento usando un programma standard di allineamento di sequenze come ALIGN, ClustalW o simili, tipicamente con impostazioni di default ed ha almeno il 50%, almeno l’80%, almeno il 90% o almeno il 95% di identità con la catena pesante di IgG1 umana.

5

10 È ben noto nel settore come allineare una sequenza o un segmento in una sequenza e così determinare la posizione corrispondente in una sequenza a una posizione di amminoacido secondo la presente invenzione.

Il termine “amminoacido corrispondente alla posizione” come usato qui si riferisce a un numero di posizione di amminoacido in una catena pesante di IgG1 umana.

15

Il termine “amminoacido” e “residuo amminoacidico” possono essere qui usati in modo intercambiabile, e non sono da interpretare come limitanti.

Nel contesto della presente divulgazione, l’amminoacido può essere definito da amminoacidi conservativi o non conservativi, e può pertanto essere classificato di conseguenza. I residui amminoacidici possono anche essere divisi in classi definite da proprietà fisiche e funzionali alternative. Pertanto, le classi di amminoacidi possono essere riflesse in una o più delle seguenti liste:

20

25



Residuo amminoacidico di classe conservativa:

Residui acidi:	D ed E
Residui basici:	K, R e H
Residui neutri idrofili:	S, T, N e Q
Residui neutri alifatici:	G, A, V, L e I
Residui neutri apolari:	C, M e P
Residui aromatici:	F, Y e W

Classificazioni fisiche e funzionali alternative di residui amminoacidici:

Residui contenenti gruppo alcolico	S e T
Residui alifatici:	I, L, V e M
Residui cicloalchenil-associati	F, H, W e Y
Residui idrofobici:	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residui carichi negativamente:	D ed E
Residui polari:	C, D, E, H, K, N, Q, R, S e T
Residui carichi positivamente:	H, K e R
Residui piccoli:	A, C, D, G, N, P, S, T e V
Residui molto piccoli:	A, G e S
Residui coinvolti nella formazione di “turn”:	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P e T
Residui flessibili:	Q, T, K, S, G, P, D, E e R

5 Nel contesto della presente invenzione, una sostituzione in un anticorpo è indicata come:

Amminoacido originario - posizione - amminoacido sostituito;



Facendo riferimento alla nomenclatura ben riconosciuta per gli amminoacidi, viene usato il codice a tre lettere, o il codice a una lettera, inclusi i codici "Xaa" o "X" per indicare qualsiasi residuo amminoacidico. Pertanto, Xaa o X possono tipicamente rappresentare qualsiasi dei 20 amminoacidi presenti in natura. Il termine "presente in natura" come usato qui si riferisce a uno qualsiasi dei seguenti residui amminoacidici: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, istidina, acido aspartico, asparagina, acido glutammico, glutammina, prolina, triptofano, fenilalanina, tirosina, metionina e cisteina. Di conseguenza, la notazione "K409R" o "Lys409Arg" significa che l'anticorpo comprende una sostituzione di Lisina con Arginina nella posizione amminoacidica 409.

La sostituzione di un amminoacido in una data posizione con un qualsiasi altro amminoacido è indicata come:

Amminoacido originario - posizione; oppure ad es. "K409"

Per una modificazione in cui lo/gli amminoacido/i originario/i e/o lo/gli amminoacido/i sostituito/i può/possono comprendere più di uno, ma non tutti gli amminoacidi, i più di un amminoacido possono essere separati mediante "," o "/". Ad esempio, la sostituzione di Lisina con Arginina, Alanina o Fenilalanina nella posizione 409 è:

"Lys409Arg,Ala,Phe" o "Lys409Arg/Ala/Phe" o "K409R,A,F" o "K409R/A/F" o "K409 in R, A, o F".

Tali denominazioni possono essere usate in modo intercambiabile nel contesto dell'invenzione ma hanno lo stesso significato e scopo.



Inoltre, il termine “una sostituzione” comprende una sostituzione in uno qualsiasi o gli altri diciannove amminoacidi naturali, o in altri amminoacidi, come amminoacidi non naturali. Ad esempio, una sostituzione dell’amminoacido K nella posizione 409 include
5 ciascuna delle seguenti sostituzioni: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P e 409Y. Questo è, a proposito, equivalente della denominazione 409X, in cui la X designa qualsiasi amminoacido diverso dall’amminoacido originario. Queste sostituzioni possono anche essere
10 denominate K409A, K409C, ecc. oppure K409A,C,ecc. oppure K409A/C/ecc. Lo stesso si applica per analogia a ciascuna delle e tutte le posizioni qui menzionate, per includere qui specificamente qualsiasi di tali sostituzioni.

L’anticorpo secondo la divulgazione può anche comprendere
15 una delezione di un residuo amminoacidico. Tale delezione può essere indicata con “del”, e include, ad es., scritture come K409del. Pertanto, in tali forme di realizzazione, la Lisina nella posizione 409 è stata cancellata dalla sequenza amminoacidica.

Sia la prima sia la seconda regione di legame dell’anticorpo
20 bispecifico possono legarsi a AXL. Tuttavia, la prima regione di legame comprende un diverso insieme di sequenze CDR rispetto alla seconda regione di legame. Pertanto, l’anticorpo bispecifico può comprendere una prima e una seconda regione di legame, e una prima e una seconda catena pesante, in cui la prima e la seconda regione di legame
25 comprendono ciascuna una regione VH e una regione VL selezionate dal



gruppo costituito da:

- 5 a) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148];
- 10 b) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente, e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733];
- 15 c) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [140];
- 20
- 25



- d) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una
5 seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 55, rispettivamente, e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154];
- e) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
10 CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente; e una seconda regione
15 VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154-M103L];
- f) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
20 CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171];
- 25 g) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172];

5 h) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una
10 prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di
15 SEQ ID No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181];

i) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di
20 SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente, [183];

j) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
25 CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima



- 5 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q];
- 10 k) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS e 82, rispettivamente, [187];
- 15 l) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, GAS e 87, rispettivamente, [608-01];
- 20 m) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3
- 25



- di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente, [610-01];
- 5
- n) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una
- 10 seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 94, 95 e 95, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613];
- o) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
- 15 CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente; e una seconda regione
- 20 VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 101, DAS e 102, rispettivamente, [613-08];
- p) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3
- 25 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una



- seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente, [620-06];
- 5 q) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente; e una
- 10 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente, [726];
- r) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una prima
- 15 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di
- 20 SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L];
- s) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda
- 25 regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di



SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733];

t) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [107];

u) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 55, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154];

v) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente; e una seconda regione



VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154-M103L];

w) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una

5 prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una

seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente; e una seconda

10 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171];

x)una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima

regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda

15 regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente; e una seconda regione

VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172];

y)una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima

20 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda

regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente; e una seconda regione

25 VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID



No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181];

z) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente, [183];

10 aa) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q];

15 bb) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS e 82, rispettivamente, [187];



- cc) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una
5 seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, GAS e 87, rispettivamente, [608-01];
- dd) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una
10 prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente; e una seconda
15 regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente, [610-01];
- ee) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3
20 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 94, 95 e 95, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613];
- 25 ff) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1,



- CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 101, DAS e 102, rispettivamente, [613-08];
- 5 gg) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente, [620-06];
- 10 hh) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente, [726];
- 20 ii) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una
- 25



prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente; e una
5 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L];

jj) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e

10 una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
15 CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [140];

kk) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e

una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e
20 una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 55, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154];

ll) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e
25



- una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente; e una
- 5 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 55, GAS e 56, rispettivamente. [154-M103L];
- mm) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e
- 10 una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente; e una
- 15 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171];
- nn) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e
- una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e
- 20 una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172];
- oo) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1,
- 25 CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e



- una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente; e una
- 5 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181];
- pp) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
- 10 CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente, [183];
- 15 qq) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2
- 20 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q];
- rr) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e
- 25 una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



- CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS e 82, rispettivamente, [187];
- 5
- ss) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e
- 10 una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, GAS e 87, rispettivamente, [608-01];
- tt) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e
- 15 una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente; e una
- 20 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente, [610-01];
- uu) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e
- 25



una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 94, 95 e 95, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613];

5 vv) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente; e una
10 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 101, DAS e 102, rispettivamente, [613-08];

ww) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente; e una
15 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente, [620-06];

xx) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e
20 una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2



e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente; e una seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente, [726], e
yy) una prima regione VH comprendente le sequenze CDR1,
5 CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente; e una prima regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente, [733]; e una seconda regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente; e una
10 seconda regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L].

Anticorpi coniugati con un agente citotossico, farmaco o simili sono anche noti come coniugati anticorpo-farmaco (ADC). Un ADC può
15 avere un'emivita di periodi di tempo sufficienti affinché il coniugato anticorpo-farmaco sia internalizzato, degradato e indurre l'uccisione di cellule da parte della tossina rilasciata.

Pertanto, un ADC può comprendere un anticorpo anti-AXL o un anticorpo bispecifico e una porzione terapeutica, come un agente
20 citotossico, un farmaco chemioterapico o simili. L'agente citotossico, il farmaco chemioterapico o simili possono essere coniugati con l'anticorpo o con l'anticorpo bispecifico mediante un linker.

Gli ADC sono spesso progettati in modo tale che il carico citotossico sia inattivo quando coniugato con l'anticorpo. Il carico
25 citotossico può essere rilasciato intracellularmente in seguito a



internalizzazione dell'ADC dopo il legame alla membrana plasmatica delle cellule, o in alternativa in risposta all'attività proteolitica nel microambiente tumorale. Il termine "internalizzato" o "internalizzazione" come usato qui si riferisce a un processo biologico in cui molecole come
5 l'AXL-ADC sono inghiottite dalla membrana cellulare e tirate all'interno della cellula. Si può anche indicare come "endocitosi".

Di conseguenza, in alcuni casi si può desiderare usare anticorpi che subiscono internalizzazione. Tali anticorpi che hanno buone proprietà di internalizzazione possono essere adatti alla
10 coniugazione con un agente citotossico, un farmaco o simili, facoltativamente mediante un linker, che è progettato per essere scisso intracellularmente.

Una volta internalizzato, l'ADC può essere erogato ai lisosomi nella maggior parte dei casi, dove il rilascio efficace di farmaco trae
15 vantaggio dall'ambiente catabolico che si trova in questi organelli. Tipicamente è un linker che collega l'anticorpo con un agente citotossico. Pertanto, sono stati progettati linker specializzati che vengano scissi solo in uno specifico microambiente che si trova nella o sulla cellula tumorale bersaglio o nel microambiente tumorale. Gli
20 esempi includono linker che sono scissi da condizioni acide, condizioni riducenti o proteasi specifiche.

La stabilità dell'anticorpo-linker-farmaco in circolazione è importante poiché questa consente l'erogazione mediata da anticorpo del farmaco a cellule bersaglio specifiche. Inoltre, la lunga emivita in
25 circolazione dell'ADC fornisce esposizione per più giorni fino a settimane



dopo l'iniezione. I farmaci che sono coniugati attraverso linker non scindibili e linker scindibili mediante proteasi sono generalmente più stabili in circolazione rispetto a linker disolfurici e idrazonici, sebbene la stabilità di questi ultimi due linker possa essere regolata alterando la
5 struttura chimica circostante (Alley *et al.*, 2010).

La porzione terapeutica può essere un agente citotossico. Una citotossina o un agente citotossico include qualsiasi agente che è dannoso per (ad es. uccide) le cellule. Agenti citotossici adeguati a formare ADC per l'uso nella presente invenzione includono taxolo,
10 tubulisine, duostatine, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossi-antracenedione ("dihydroxy anthracin dione"), maytansina o un loro analogo o derivato, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotosterone,
15 glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, e puromicina; calicheamicina o loro analoghi o derivati; antimetaboliti (come metotrexato, 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracile, decarbazina, idrossiurea, asparaginasi, gemcitabina, cladribina), agenti alchilanti (come mecloretamina,
20 "thioepa", clorambucile, melfalan, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfano, dibromomannitolo, streptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino e altri derivati del platino, come carboplatino; così come duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (anche noto come rachelmicina), o analoghi
25 o derivati di CC-1065), dolastatina, auristatina, pirrolo [2,1-c] [1,4]



benzodiazepine (PDB), indolinobenzodiazepine (IGN) o loro analoghi, antibiotici (come dactinomicina (precedentemente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (precedentemente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrone, plicamicina, antramicina (“anthramycin”) (AMC)), agenti antimitotici (ad es. agenti che bersagliano la tubulina), come tossina difterica e molecole affini (come catena A della difterite e suoi frammenti attivi e molecole ibride); tossina ricina (come ricina A o una tossina con catena A della ricina deglicosilata), tossina colerica, una tossina “Shiga-simile” (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), tossina LT, tossina C3, tossina di Shiga, tossina della pertosse, tossina tetanica, inibitore di proteasi Bowman-Birk di soia, esotossina di *Pseudomonas*, alorin, saporina, modeccina, gelatin, catena A dell’abrina, catena A di modeccina, alfa-sarcina, proteine di *Aleurites fordii*, proteine diantina, proteine di *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibitore di *momordica charantia*, curcina, crotina, inibitore di *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina (“phenomycin”), e tossine di enomicina (“enomycin”). Altre molecole coniugate adeguate includono peptidi antimicrobici/litici come CLIP, Magainina 2, mellitina, Cecropina, e P18; ribonucleasi (RNasi), DNasi I, enterotossina stafilococcica-A, proteina antivirale di fitolacca, tossina difterica ed endotossina di *Pseudomonas*. Si vedano, ad esempio, Pastan *et al.*, *Cell* 47, 641 (1986) and Goldenberg, *Calif. A Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994). Gli agenti terapeutici che possono essere somministrati in combinazione con anticorpi anti-AXL o coniugati anticorpo-farmaco per l’uso secondo



la presente invenzione come descritto in altre parti di questo testo, come, ad es., citochine o chemochine anticancro, sono anch'essi candidati a porzioni terapeutiche utili per la coniugazione con un anticorpo per l'uso secondo la presente invenzione.

5 Il termine "agente citotossico" come usato qui si riferisce a qualsiasi agente che è dannoso per (ad es. uccide) le cellule. Per una descrizione di queste classi di farmaci che sono ben noti nel settore e i loro meccanismi di azione, si veda Goodman *et al.* (1990). Ulteriori tecniche rilevanti per la preparazione di immunotossine da anticorpo
10 sono fornite ad esempio in Vitetta *et al.* (1993) and US 5,194,594.

 In una forma di realizzazione, l'agente citotossico è collegato a detto anticorpo, o a un suo frammento, con un linker scindibile, come N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-pentanoato (SSP), maleimidocaproil-valina-citrullina-p-amminobenzilossicarbonile (mc-vc-PAB) o AV-1 K-
15 lock valina-citrullina.

 Il termine "linker scindibile" come usato qui si riferisce a un sottoinsieme di linker che sono catalizzati da specifiche proteasi nella cellula bersagliata o nel microambiente tumorale, il che porta al rilascio dell'agente citotossico. Esempi di linker scindibili sono linker basati su
20 motivi chimici inclusi disolfuri, idrazoni o peptidi. Un altro sottoinsieme di linker scindibili aggiunge un motivo di linker aggiuntivo tra l'agente citotossico e il linker primario, ossia il sito che attacca la combinazione linker-farmaco all'anticorpo. Il motivo di linker aggiuntivo può essere scindibile da un agente scindibile che è presente nell'ambiente
25 intracellulare (ad es. all'interno di un lisosoma o endosoma o caveola). Il



linker può essere, ad es., un linker peptidilico che è scisso da un enzima intracellulare peptidasi o proteasi, tra cui, ma non limitatamente a, una proteasi lisosomiale o endosomiale. In alcune forme di realizzazione, il linker peptidilico è lungo almeno due
5 amminoacidi o lungo almeno tre amminoacidi. Gli agenti che scindono possono includere catepsina B e D e plasmina, che sono tutti sono noti per idrolizzare i derivati di farmaco dipeptidici portando al rilascio di farmaco attivo dentro alle cellule bersaglio (si veda ad es. Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). In una forma di
10 realizzazione specifica, il linker peptidilico scindibile mediante una proteasi intracellulare è un linker Val-Cit (valina-citrullina) o un linker Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (si veda ad es. US6214345, che descrive la sintesi di doxorubicina con il linker Val-Cit). Un vantaggio dell'usare il rilascio proteolitico intracellulare dell'agente terapeutico è che l'agente è
15 tipicamente attenuato quando coniugato e le stabilità nel siero dei coniugati sono tipicamente alte.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente citotossico è collegato a detto anticorpo, o suo frammento, mediante un linker non scindibile, come succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloesano-1-
20 carbossilato (MCC) o maleimidocaproile (MC).

Il termine "linker non scindibile" come usato qui si riferisce a un sottoinsieme di linker che, al contrario dei linker scindibili, non comprendono motivi che sono specificamente e prevedibilmente riconosciuti da proteasi intracellulari o extracellulari. Pertanto, gli ADC
25 basati su linker non scindibili non sono rilasciati o scissi dall'anticorpo



fino a quando il completo complesso anticorpo-linker-farmaco non è degradato nel compartimento lisosomiale. Esempi di un linker non scindibile sono i tioeteri. L'unità linker può non essere scindibile e il farmaco può essere rilasciato mediante degradazione dell'anticorpo (si veda US 2005/0238649). Tipicamente, un tale linker non è considerevolmente sensibile all'ambiente extracellulare. Come usato qui, "non considerevolmente sensibile all'ambiente extracellulare" nel contesto di un linker significa che non più del 20%, tipicamente non più di circa 15%, più tipicamente non più di circa 10%, e ancor più tipicamente non più di circa 5%, non più di circa 3%, o non più di circa 1% dei linker, in un campione di composto coniugato anticorpo-farmaco, sono scissi quando il composto coniugato anticorpo-farmaco è presente in un ambiente extracellulare (ad es. plasma). Si può determinare se un linker è non considerevolmente sensibile all'ambiente extracellulare ad esempio incubando con plasma il composto coniugato anticorpo-farmaco per un periodo di tempo predeterminato (ad es. 2, 4, 8, 16 o 24 ore) e poi quantificando la quantità di farmaco libero presente nel plasma.

In una forma di realizzazione, l'agente citotossico è selezionato dal gruppo: agenti che bersagliano DNA, ad es. alchilanti e reticolanti del DNA, come calicheamicina, duocarmicina, rachelmicina (CC-1065), pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiazepine (PBD) e indolinobenzodiazepina (IGN); agenti che bersagliano microtuboli come duostatina, come duostatina-3, auristatina, come la monometil auristatina E (MMAE) e la monometil auristatina-F (MMAF), dolastatina, maytansina, N(2')-deacetil-N(2')-(3-



marcapto-1-ossopropil)-maytansina (DM1), e tubulisina; e analoghi nucleosidici; o loro analoghi, derivati o profarmaci.

In una forma di realizzazione, l'AXL-ADC comprende una combinazione di:

- 5 i) un linker scindibile e un agente citotossico che ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander;
- ii) un linker scindibile e un agente citotossico che non ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander;
- iii) un linker non scindibile e un agente citotossico che ha la
10 capacità di uccidere mediante effetto bystander; o
- iv) un linker non scindibile e un agente citotossico che non ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander.

Il termine “effetto di uccisione bystander”, “uccisione mediante effetto bystander”, “capacità di uccidere mediante effetto bystander” o
15 “citotossicità mediante effetto bystander” come usato qui si riferisce all'effetto in cui l'agente citotossico che è coniugato all'anticorpo mediante un linker scindibile o non scindibile ha la capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari dopo il rilascio dall'anticorpo e in tal modo causare l'uccisione di cellule vicine. Quando
20 l'agente citotossico è coniugato mediante un linker scindibile o non scindibile, la capacità di uccidere mediante effetto bystander può essere posseduta o dal solo agente citotossico oppure dall'agente citotossico con una parte del linker. La capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari è correlata all'idrofobicità dell'agente citotossico o
25 della combinazione dell'agente citotossico e del linker. Tali agenti



citotossici possono essere vantaggiosamente tossine che possono permeare la membrana, come MMAE che è stata rilasciata dall'anticorpo mediante proteasi. In particolare, nei tumori con espressione eterogenea del bersaglio e nei tumori solidi in cui la
5 penetrazione dell'anticorpo può essere limitata, si può desiderare un effetto di uccisione bystander.

Il termine “nessuna capacità di uccidere mediante effetto bystander”, “nessun effetto di uccisione bystander”, “nessuna uccisione mediante effetto bystander” o “nessuna citotossicità mediante effetto
10 bystander” come usato qui si riferisce all'effetto in cui l'agente citotossico che è coniugato all'anticorpo mediante un linker scindibile o non scindibile non ha la capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari dopo il rilascio dall'anticorpo. Pertanto, tali agenti citotossici o combinazioni dell'agente citotossico con il linker non saranno in grado
15 di uccidere le cellule vicine in seguito al rilascio dall'anticorpo. Si crede, senza essere legati alla teoria, che tali combinazioni di un agente citotossico e un linker o scindibile o non scindibile uccideranno solo le cellule che esprimono il bersaglio a cui si lega l'anticorpo.

Un collegamento stabile tra l'anticorpo e l'agente citotossico è
20 un fattore importante di un ADC. È stato dimostrato che sia il tipo di linker scindibile sia quello non scindibile sono sicuri nella sperimentazione preclinica e clinica.

L'agente citotossico può essere scelto dal gruppo degli agenti che bersagliano microtuboli, come auristatine e “maytansinoid”.

25 Il termine “agente che bersaglia microtuboli” come usato qui si



riferisce a un agente o farmaco che inibisce la mitosi (divisione cellulare). I microtuboli sono strutture che sono essenziali per la corretta separazione del DNA durante la divisione cellulare, e la funzione dei microtuboli dipende criticamente dall'“instabilità
5 dinamica”, ossia il processo in cui le strutture di microtuboli sono continuamente allungate e accorciate. Gli agenti che bersagliano microtuboli interrompono o stabilizzano i microtuboli, il che evita la formazione del fuso mitotico, portando all'arresto mitotico e all'apoptosi. Gli agenti che bersagliano microtuboli possono essere derivati da, ad
10 es., sostanze naturali come alcaloidi vegetali, ed evitano che le cellule subiscano mitosi interrompendo o stabilizzando la polimerizzazione dei microtuboli, prevenendo quindi la formazione del fuso mitotico e la successiva divisione cellulare, il che porta all'inibizione della crescita del cancro. Esempi di agenti che bersagliano microtuboli sono paclitaxel,
15 docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, duostatine, auristatine, “maytansanoid”, tubulisine e dolastatina.

L'agente citotossico è auristatine o derivati o analoghi peptidici di auristatina (US 5,635,483; US 5,780,588). È stato dimostrato che le auristatine interferiscono con la dinamica dei microtuboli, l'idrolisi di
20 GTP e la divisione nucleare e cellulare (Woyke *et al.*, 2001) e che hanno attività anti-cancro (US 5,663,149) e antimicotica (Pettit, 1998). La porzione farmaco auristatina può essere attaccata all'anticorpo mediante un linker, attraverso l'N (ammino)-terminale o il C (terminale) della porzione farmaco peptidica.

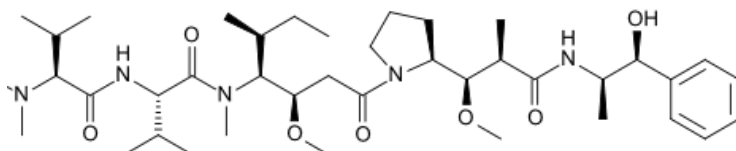
25 Forme di realizzazione esemplificative di auristatina includono



le porzioni farmaco monometil auristatina collegate all'N-terminale D_E e D_F, divulgate in Senter *et al.* (2004) e descritte in US 2005/0238649.

L'agente citotossico può essere in particolare monometil auristatina E (MMAE),

5

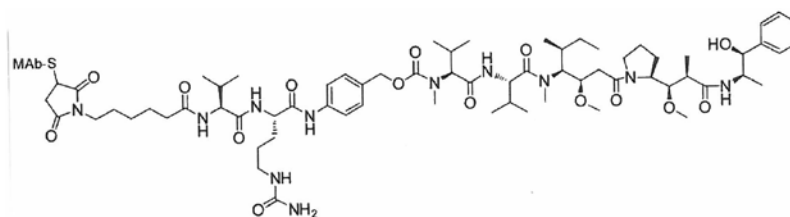


in cui l'anticorpo è collegato con MMAE in corrispondenza dell'azoto (N) sul lato sinistro della struttura chimica di cui sopra mediante il linker appropriato.

L'agente citotossico monometil auristatina E (MMAE) può essere collegato all'anticorpo mediante un linker valina-citrullina (VC).

L'agente citotossico monometil auristatina E (MMAE) può essere collegato all'anticorpo mediante un linker valina-citrullina (VC) e il linker maleimidocaproile (MC), in cui la combinazione dell'agente citotossico e dei linker ha la struttura chimica:

20

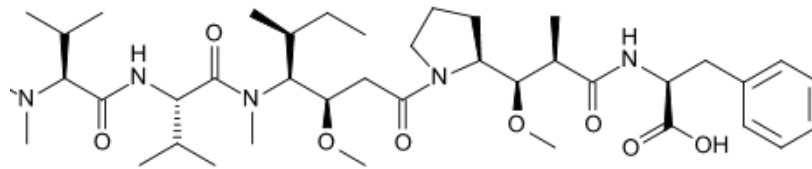


in cui MAb è l'anticorpo.

L'agente citotossico può essere monometil auristatina F (MMAF);

25

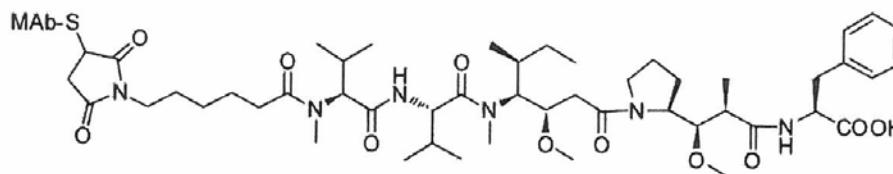
GEN014ESM



in cui l'anticorpo è collegato con MMAF in corrispondenza dell'azoto (N) sul lato sinistro della struttura chimica di cui sopra
5 mediante il linker appropriato.

L'agente citotossico monometil auristatina F (MMAF) può essere collegato all'anticorpo mediante un linker maleimidocaproile (mc), in cui la combinazione dell'agente citotossico e del linker ha la struttura chimica:

10



15

in cui MAb è l'anticorpo.

L'agente citotossico può essere duostatina-3.

L'agente citotossico può essere un agente che bersaglia il DNA.

Il termine "agente che bersaglia il DNA" come usato qui si
20 riferisce a una specifica classe di agenti citotossici che sono in grado di alchilare e/o reticolare il DNA. Un esempio di tale agente che agisce sul DNA sono gli agenti IGN comprendenti dimeri di indolino-benzodiazepina e pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiazepine (PBD) che sono molto potenti in virtù della loro capacità di alchilare e reticolare il DNA.
25 Un altro esempio sono agenti IGN comprendenti monomeri di indolino-



benzodiazepina che sono molto potenti in virtù della capacità di alchilare solo il DNA. Le duocarmicine sono un'altra classe di agenti che agiscono sul DNA. Le duocarmicine sono agenti alchilanti, a piccola molecola, sintetici, che si legano al solco ("groove") minore del DNA.

5 Questi composti sono adatti a bersagliare i tumori solidi così come i tumori ematologici.

L'AXL-ADC comprende da due a quattro molecole citotossiche per anticorpo. A seconda delle proprietà chimiche della tossina e della combinazione linker-tossina, da due a quattro molecole citotossiche per anticorpo possono essere migliori di coniugati carichi più pesantemente che sono smaltiti più rapidamente dalla circolazione rispetto a coniugati carichi meno. Il caricamento dell'agente citotossico è rappresentato da p ed è il numero medio di porzioni agente citotossico per anticorpo in una molecola (anche denominato il rapporto tra farmaco e anticorpo, 10 DAR). Il caricamento dell'agente citotossico può essere compreso nell'intervallo da 1 a 20 porzioni farmaco per anticorpo e può avvenire su amminoacidi con gruppi funzionali utili come, ma non limitatamente a, gruppo amminici o sulfidrilici, come nella lisina o cisteina. 15

Il numero di agenti citotossici per anticorpo può essere compreso tra 1 e 8, come tra 2 e 7, come tra 2 e 6, come tra 2 e 5, come tra 2 e 4, e come tra 2 e 3. 20

L'AXL-ADC può comprendere da quattro a otto molecole citotossiche per anticorpo. L'AXL-ADC può comprendere da sei a dieci molecole citotossiche per anticorpo. L'AXL-ADC può comprendere da 10 a 30, come da 15 a 25, come 20, molecole citotossiche per anticorpo. 25



A seconda della modalità di coniugazione, p può essere limitato dal numero di siti di attacco sull'anticorpo, ad esempio dove l'attacco è un tiolo di cisteina o una lisina. In generale, gli anticorpi non contengono molti gruppi tiolici di cisteina liberi e reattivi che possono
5 essere collegati a una porzione farmaco poiché la maggior parte dei residui tiolici di cisteina negli anticorpi esiste come ponti disolfuro. Pertanto, laddove l'agente citotossico è coniugato attraverso un tiolo di cisteina, l'anticorpo può essere ridotto con agente riducente come ditionitrotolo (DTT) o tricarbonilettilfosfina (TCEP), in condizioni
10 parzialmente o totalmente riducenti, per generare gruppi tiolici di cisteina reattivi. In certe forme di realizzazione, il caricamento del farmaco per un ADC dell'invenzione è compreso tra 1 e circa 8, poiché dopo (parziale) riduzione dell'anticorpo diventa disponibile un massimo di 8 gruppi tiolici di cisteina liberi (vi sono 8 cisteine coinvolte nel
15 legame disolfuro tra catene).

La porzione linker farmaco può essere vcMMAE. La porzione linker farmaco vcMMAE e i metodi di coniugazione sono divulgati in WO 2004/010957; US 7,659,241; US 7,829,531; e US 7,851,437 (Seattle Genetics). vcMMAE è formato mediante coniugazione del linker mc-vc-
20 PAB e della porzione citotossica MMAE, e la porzione linker farmaco vcMMAE è legata agli anticorpi anti-AXL in corrispondenza dei residui di cisteina usando un metodo simile a quelli ivi divulgati, ad es., come descritto nell'Esempio 8.

La porzione linker farmaco può essere mcMMAF. La porzione
25 linker farmaco mcMMAF e i metodi di coniugazione sono divulgati in US



7,498,298; US 7,994,135 e WO 2005/081711 (Seattle Genetics), e la porzione linker farmaco mcMMAF è legata agli anticorpi anti-AXL in corrispondenza dei residui di cisteina usando un metodo simile a quelli ivi divulgati.

5 L'agente citotossico può essere collegato a 1 o 2 lisine all'interno della sequenza amminoacidica dell'anticorpo mediante coniugazione K-Lock™ come descritto in WO 2013/173391, WO 2013/173392 e WO 2013/173393 (Concortis Biosystems). Anche la duostatina-3 (anche nota come Duo3) può essere legata agli anticorpi
10 anti-AXL in corrispondenza dei residui di lisina usando un metodo simile a quelli ivi descritti.

Altre tecnologie di linker possono essere usate nei coniugati anticorpo anti-AXL - farmaco per l'uso dell'invenzione, come linker comprendenti un gruppo idrossilico.

15 Il linker può essere attaccato a residui liberi di cisteina dell'anticorpo anti-AXL ottenuti mediante (parziale) riduzione dell'anticorpo anti-AXL.

In una forma di realizzazione particolare, il linker è mc-vc-PAB e l'agente citotossico è MMAE. In alternativa, il linker SSP e l'agente
20 citotossico è DM1.

Il linker può essere MMC e l'agente citotossico può essere DM1; o il linker può essere MC e l'agente citotossico può essere MMAF.

Il linker può essere il linker scindibile AV1-K lock e l'agente citotossico può essere duostatina-3.

25 L'AXL-ADC può comprendere il linker mc-vc-PAB, l'agente



citotossico MMAE e un anticorpo in cui l' almeno una regione di legame comprende una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da:

In una forma di realizzazione, l' anticorpo comprende almeno
5 una regione di legame comprendente una regione VH e una regione VL selezionate dal gruppo costituito da:

(y) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID
10 No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107];

(z) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 47 e 48, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID
15 No.: 49, AAS e 50, rispettivamente, [148];

(aa) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 114, 115 e 116, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di
20 SEQ ID No.: 117, DAS e 118, rispettivamente [733];

(bb) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 53, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID
25 No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154];

(cc) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 51, 52 e 54, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID



No.: 55, GAS e 56, rispettivamente [154-M103L];

(dd) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 57, 58 e 59, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente, [171];

(ee) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 62, 63 e 64, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 65, GAS e 66, rispettivamente, [172];

(ff) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 67, 68 e 69, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 70, GAS e 71, rispettivamente, [181];

(gg) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 73 e 75, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183];

(hh) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 72, 74 e 75, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 76, ATS e 77, rispettivamente [183-N52Q];

(ii) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 78, 79 e 80, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 81, AAS e 82, rispettivamente, [187];



- (jj) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 83, 84 e 85, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 86, GAS e 87, rispettivamente [608-01];
- 5 (kk) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 88, 89 e 90, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 91, GAS e 92, rispettivamente [610-01];
- (ll) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
10 CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente, [613];
- (mm) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
15 CDR3 di SEQ ID No.: 98, 99 e 100, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 101, DAS e 102, rispettivamente [613-08];
- (nn) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
20 CDR3 di SEQ ID No.: 103, 104 e 105, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 106, GAS e 107, rispettivamente [620-06];
- (oo) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e
CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 110, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente, [726];
- 25 (pp) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



CDR3 di SEQ ID No.: 108, 109 e 111, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726-M101L];

(qq) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 41, 42 e 43, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 44, AAS e 45, rispettivamente, [140];

(rr) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 93, 94 e 95, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 128, XAS, in cui X è D o G, e 129, rispettivamente [613/613-08];

(ss) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 46, 119 e 120, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 49, AAS e 50, rispettivamente [148/140];

(tt) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 123, 124 e 125, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 60, GAS e 61, rispettivamente [171/172/181]; e

(uu) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 121, 109 e 122, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 112, AAS e 113, rispettivamente [726/187]; e

(vv) una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e



CDR3 di SEQ ID No.: 93, 126 e 127, rispettivamente, e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 96, GAS e 97, rispettivamente [613/608-01/610-01/620-06];

5 Un coniugato anticorpo anti-AXL farmaco può comprendere un acido nucleico coniugato o una molecola associata ad un acido nucleico. L'acido nucleico coniugato può essere una ribonucleasi citotossica, un acido nucleico antisense, una molecola inibitoria di RNA (ad es. una molecola di siRNA) o un acido nucleico immunostimolante
10 (ad es. una molecola di DNA immunostimolante contenente un motivo di CpG).

Un anticorpo anti-AXL può essere coniugato ad un aptamero o ad un ribozima o ad un suo analogo o derivato peptidico funzionale.

Sono forniti coniugati anticorpo anti-AXL farmaco
15 comprendenti uno o più amminoacidi radiomarcati. Un anticorpo anti-AXL radiomarcato può essere utilizzato sia a scopi diagnostici che terapeutici (la coniugazione a molecole radiomarcate è un'altra possibile caratteristica). Esempi non limitativi di marcature per polipeptidi
20 includono ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc e ^{125}I , ^{131}I e ^{186}Re . I metodi per preparare amminoacidi radiomarcati e relativi derivati peptidici sono noti nell'arte (vedi ad esempio Junghans et al. (1996); US 4,681,581; US 4,735,210; US 5,101,827; US 5,102,990; US 5,648,471; e US 5,697,902. Ad esempio, un radioisotopo alogeno può essere coniugato
mediante un metodo con cloramina T.

25 L'anticorpo può essere coniugato con un radioisotopo o con



un chelante contenente un radioisotopo. Ad esempio, l'anticorpo può essere coniugato con un linker chelante, ad es. DOTA, DTPA o tiuxetano, che consente all'anticorpo di essere complessato con un radioisotopo. L'anticorpo può anche o in alternativa comprendere o essere coniugato ad uno o più amminoacidi radiomarcati o ad altre molecole radiomarcate. Un anticorpo radiomarcato anti-AXL può essere usato per gli scopi diagnostici e terapeutici. Esempi non limitativi di radioisotopi includono ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bs , ^{225}Ac e ^{227}Th .

10 Gli anticorpi anti-AXL possono anche essere modificati chimicamente mediante coniugazione covalente ad un polimero, per esempio, per aumentare la loro emivita in circolazione. Polimeri di esempio e i metodi per attaccarli ai peptidi sono illustrati per esempio in US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 e US 4,609,546. Polimeri
15 aggiuntivi includono polioli poliossietilati e polietilenglicole (PEG) (ad esempio un PEG con un peso molecolare compreso tra circa 1.000 e circa 40.000, come tra circa 2.000 e circa 20.000). Questo può ad esempio essere usato se l'anticorpo anti-AXL è un frammento.

Può essere impiegato qualsiasi metodo noto nell'arte per
20 coniugare l'anticorpo anti-AXL alle molecole coniugate, come quelle descritte sopra, inclusi i metodi descritti da Hunter et al. (1974), Pain et al. (1981) e Nygren (1982). Tali anticorpi possono essere prodotti coniugando chimicamente l'altra porzione ("moiety") al lato N-terminale o al lato C-terminale dell'anticorpo anti-AXL (ad esempio, una catena H
25 o L dell'anticorpo anti-AXL) (si veda, ad esempio, Kanemitsu, 1994). Tali



derivati anticorpali coniugati possono anche essere generati mediante coniugazione a residui o zuccheri interni, o ad amminoacidi non presenti in natura o ad ulteriori amminoacidi che sono stati introdotti nel dominio costante dell'anticorpo, dove adeguato.

5 Gli agenti possono essere accoppiati direttamente o indirettamente ad un anticorpo anti-AXL. Un esempio di accoppiamento indiretto di un secondo agente è l'accoppiamento attraverso una porzione distanziale a residui di cisteina o lisina nell'anticorpo. In una forma di realizzazione, un anticorpo anti-AXL è coniugato, tramite un
10 distanziatore o un linker, ad una molecola di profarmaco che può essere attivata *in vivo* per un farmaco terapeutico. Dopo la somministrazione, i distanziatori o i linker vengono scissi da enzimi associati alle cellule tumorali o da altre condizioni specifiche tumorali, in cui si forma il farmaco attivo. Esempi di tali tecnologie di pro-farmaco e linker sono
15 descritti in WO 2002/083180, WO 2004/043493, WO 2007/018431, WO 2007/089149, WO 2009/017394 e WO 2010/62171 (Syngenta BV). Una tecnologia anticorpo-pro-farmaco ed analoghi della duocarmicina adatti possono essere anche trovati in US 6,989,452 (Medarex).

20 L'anticorpo anti-AXL può essere attaccato a un linker chelante, ad es. tiuxetano, che consente all'anticorpo di essere coniugato a un radioisotopo.

Combinazioni, composizioni e kit

25 L'AXL-ADC per l'uso secondo la presente descrizione può essere somministrato sotto forma di una composizione. La composizione può essere una composizione farmaceutica comprendente l'AXL-ADC e



un veicolo farmaceutico.

L'AXL-ADC o la composizione farmaceutica comprendente l'AXL-ADC può essere per l'uso nel trattamento di una neoplasia in combinazione con l'almeno un agente terapeutico con cui la neoplasia viene o è stata trattata, cioè l'agente chemioterapico, l'inibitore di 5 tirosina chinasi, l'inibitore di PI3K, il mAb/rTKI e/o l'inibitore di serina/treonina chinasi secondo qualsiasi aspetto o forma di realizzazione precedenti. Ad esempio, l'agente terapeutico può essere un agente chemioterapico, un TKI o un S/Th TKI secondo qualsiasi aspetto 10 o forma di realizzazione precedenti. Tipicamente, l'AXL-ADC e l'agente terapeutico sono somministrati separatamente.

La composizione farmaceutica comprendente l'AXL-ADC può inoltre comprendere l'almeno un agente terapeutico con cui la neoplasia viene o è stata trattata, cioè l'agente chemioterapico, l'inibitore di 15 tirosina chinasi, l'inibitore di PI3K, inibitore il mAb/rTKI e/o l'inibitore di serina/treonina chinasi secondo qualsiasi aspetto o forma di realizzazione precedenti. Per esempio, l'agente terapeutico può essere un agente chemioterapico, un TKI o un S/Th TKI secondo qualsiasi aspetto o forma di realizzazione precedenti. Gli AXL-ADC per l'uso 20 secondo la presente invenzione in combinazione con l'almeno un agente terapeutico può anche essere fornito sotto forma di kit, per la somministrazione simultanea, separata o sequenziale, in cui il kit può inoltre comprendere le istruzioni per l'uso. L'ADC e l'almeno un agente terapeutico sono tipicamente formulati come composizioni 25 farmaceutiche separate.



L'inibitore di tirosina chinasi nella combinazione, composizione o kit può essere un antagonista di EGFR.

L'inibitore di tirosina chinasi nella combinazione, composizione o kit può essere selezionato dal gruppo costituito da
5 erlotinib, gefitinib, lapatinib, imatinib, sunitinib, crizotinib, midostaurin (PKC412) e quizartinib (AC220), come, ad es. erlotinib o un suo analogo o derivato come lapatinib, gefitinib o. Preferibilmente, l'inibitore di tirosina chinasi è erlotinib.

L'inibitore di serina/treonina chinasi nella combinazione,
10 composizione o kit può essere selezionato tra vemurafenib, dabrafenib, selumetinib (AZD6244), VTX11E, trametinib e PLX4720.

L'inibitore di BRAF nella combinazione, composizione o kit può essere vemurafenib (PLX4032) o un suo analogo o derivato
15 terapeuticamente efficace, come dabrafenib o PLX4720. L'inibitore di BRAF può essere vemurafenib. In una forma di realizzazione, l'inibitore di BRAF può essere dabrafenib.

L'inibitore di serina/treonina chinasi nella combinazione, composizione o kit può comprendere almeno un inibitore di BRAF e
20 almeno un inibitore di MEK, in cui l'almeno un inibitore di BRAF è scelto tra vemurafenib, dabrafenib e una loro combinazione, e in cui l'inibitore di MEK è selezionato tra selumetinib (AZD6244) e trametinib, e una loro combinazione. Ad esempio, la combinazione, composizione o kit può comprendere dabrafenib e trametinib; vemurafenib e trametinib; dabrafenib, vemurafenib e trametinib; dabrafenib e selumetinib; o
25 vemurafenib e selumetinib.



L'almeno un agente chemioterapico nella combinazione, composizione o kit può essere un taxano, per esempio selezionato tra paclitaxel e docetaxel.

5 L'almeno un agente chemioterapico nella combinazione, composizione o kit può essere selezionato dal gruppo costituito da cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etoposide e metformina.

L'inibitore di PI3K nella combinazione, composizione o kit può essere alpelisib (BYL719).

10 Il mAb/rT nella combinazione, composizione o kit può essere Cetuximab o MAB391.

I kit possono inoltre includere, se desiderato, uno o più dei vari componenti di kit farmaceutici convenzionali, come, ad esempio, i contenitori con uno o più veicoli farmaceuticamente accettabili, contenitori aggiuntivi, ecc., come sarà facilmente evidente a quelli
15 esperti del ramo. Le istruzioni stampate, sia come inserti che come etichette, che indicano le quantità dei componenti da somministrare, le linee guida per la somministrazione e/o le linee guida per la miscelazione dei componenti, possono anche essere incluse nel kit.

20 Le composizioni farmaceutiche possono essere formulate con veicoli o diluenti farmaceuticamente accettabili nonché qualsiasi altri coadiuvanti ed eccipienti noti secondo tecniche convenzionali come quelle divulgate in Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995).

25 I veicoli o diluenti farmaceuticamente accettabili, nonché qualsiasi altri adiuvanti ed eccipienti noti, dovrebbero essere adatti per



l'AXL-ADC e la modalità di somministrazione scelta. L'idoneità per
veicoli e altri componenti delle composizioni farmaceutiche è
determinata in base alla mancanza di un significativo impatto negativo
sulle proprietà biologiche desiderate del composto o della composizione
5 farmaceutico/a scelto/a (ad esempio, meno di un impatto sostanziale
(inibizione relativa del 10% o meno, inibizione relativa del 5% o meno,
ecc.) sul legame all'antigene).

Una composizione farmaceutica può includere anche diluenti,
riempitivi, sali, tamponi, detergenti (ad esempio un detergente non
10 ionico, come Tween-20 o Tween-80), stabilizzanti (ad es. zuccheri o
amminoacidi privi di proteine), conservanti, fissativi tessutali,
solubilizzanti e/o altri materiali adatti per l'inclusione in una
composizione farmaceutica.

I livelli di dosaggio effettivi dei principi attivi nelle
15 composizioni farmaceutiche possono essere variati in modo da ottenere
una quantità del principio attivo che è efficace per ottenere la risposta
terapeutica desiderata per un particolare paziente, composizione e
modalità di somministrazione, senza essere tossico per il paziente. Il
livello di dosaggio selezionato dipenderà dalla una varietà di fattori
20 farmacocinetici che includono l'attività delle composizioni particolari, la
via di somministrazione, il tempo di somministrazione, la velocità di
escrezione del particolare composto impiegato, la durata del
trattamento, altri farmaci, composti e/o materiali usati in combinazione
con le particolari composizioni impiegate, l'età, il sesso, il peso, la
25 condizione, la salute generale e l'anamnesi pregressa del paziente in



trattamento, e fattori simili ben noti nel settore medico.

La composizione farmaceutica può essere somministrata mediante qualsiasi via e modalità adatta. Le vie adatte di somministrazione di un composto della presente invenzione *in vivo e in vitro* sono ben note nella tecnica e possono essere selezionate tra quelle di ordinaria abilità nell'arte.

La composizione farmaceutica può essere somministrata per via parenterale.

I termini "somministrazione parenterale" e "somministrati per via parenterale" come qui utilizzati si riferiscono a modalità di somministrazione diverse dalla somministrazione enterale e topica, generalmente per iniezione, e comprendono iniezione e infusione epidermica, endovenosa, intramuscolare, intra-arteriosa, intratecale, intracapsulare, intraorbitale, intracardiaca, intradermica, intraperitoneale, intratendinea, transtracheale, sottocutanea, sottocuticolare, intra-articolare, subcapsulare, subaracnoideo, intraspinale, intracranica, intratoracica, epidurale e intrasternale.

La composizione farmaceutica può essere somministrata mediante iniezione o infusione endovenosa o sottocutanea.

I veicoli farmaceuticamente accettabili includono tutti i solventi adatti, i mezzi di dispersione, i rivestimenti, gli agenti antibatterici e antifungini, gli agenti di isotonicità, gli antiossidanti e gli agenti ritardanti dell'assorbimento e simili che sono fisiologicamente compatibili con un AXL-ADC o un agente terapeutico per l'uso secondo la presente invenzione.



Esempi di veicoli acquosi e non acquosi adatti che possono essere impiegati nelle composizioni farmaceutiche comprendono acqua, soluzione salina, soluzione salina tamponata con fosfato, etanolo, destrosio, polioli (come glicerolo, glicole propilenico, polietilenglicole e
5 simili) e loro miscele adatte, oli vegetali, come olio di oliva, olio di mais, olio di arachidi, olio di semi di cotone e olio di sesamo, soluzioni colloidali di carbosimetilcellulosa, gomma di tragacanto ed esteri organici iniettabili, come etil oleato e/o vari tamponi. Altri veicoli sono ben noti nel settore farmaceutico.

10 I veicoli farmaceuticamente accettabili includono soluzioni o dispersioni acquose sterili e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni iniettabili o dispersione sterili. L'uso di tali mezzi ed agenti per le sostanze farmaceuticamente attive sono note
15 nella tecnica. Tranne nella misura in cui un qualsiasi mezzo o agente convenzionale è incompatibile con il principio attivo, è previsto il suo utilizzo nelle composizioni farmaceutiche.

La corretta fluidità può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di materiali di rivestimento, come la lecitina, mediante il mantenimento della dimensione delle particelle richiesta nel caso di
20 dispersioni, e mediante l'uso di tensioattivi.

Le composizioni farmaceutiche possono anche comprendere antiossidanti farmaceuticamente accettabili, ad esempio (1) antiossidanti solubili in acqua, come acido ascorbico, cisteina cloridrato, bisolfato di sodio, metabisolfito di sodio, sodio solfito e simili;
25 (2) antiossidanti solubili in olio, come ascorbil palmitato,



butilidrossianisolo (BHA), idrossitoluene butilato (BHT), lecitina, propile gallato, alfa-tocoferolo e simili; e (3) agenti che chelano i metalli, ad esempio acido citrico, acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), sorbitolo, acido tartarico, acido fosforico e simili.

5 Le composizioni farmaceutiche possono anche comprendere agenti di isotonicità, come zuccheri, polialcoli, come mannitolo, sorbitolo, glicerolo o cloruro di sodio nelle composizioni.

Le composizioni farmaceutiche possono anche contenere uno o più adiuvanti appropriati per la via di somministrazione scelta, come
10 conservanti, agenti bagnanti, agenti emulsionanti, agenti disperdenti, conservanti o tamponi, che può migliorare la durata di conservazione o l'efficacia della composizione farmaceutica. Gli AXL-ADC o gli agenti terapeutici per gli usi della presente invenzione possono essere preparati con supporti che proteggeranno il composto dal rapido
15 rilascio, come una formulazione a rilascio controllato, compresi impianti, cerotti transdermici e sistemi di somministrazione microincapsulati. Tali veicoli possono includere gelatina, gliceril monostearato, gliceril distearato, polimeri biodegradabili, biocompatibili come etilene vinil acetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene,
20 poliortoesteri e acido polilattico da solo o con una cera, o altri materiali ben noti nella tecnica. I metodi per la preparazione di tali formulazioni sono generalmente noti a quelli esperti nell'arte. Si veda ad es. Robinbson: Substained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978).

25 I composti possono essere formulati per garantire una corretta



distribuzione *in vivo*. Veicoli farmaceuticamente accettabili per la somministrazione parenterale includono soluzioni o dispersioni acquose sterili e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersione iniettabili sterili. L'uso di tali mezzi e agenti per sostanze farmaceuticamente attive è noto nella tecnica. Tranne nella misura in cui un qualsiasi mezzo o agente convenzionale è incompatibile con il principio attivo, è previsto il suo utilizzo nelle composizioni farmaceutiche. Altri composti attivi o terapeutici possono essere anche incorporati nelle composizioni.

10 Le composizioni farmaceutiche per iniezione devono essere tipicamente sterili e stabili nelle condizioni di produzione e stoccaggio. La composizione può essere formulata come soluzione, micro-emulsione, liposoma o altra struttura ordinata adatta ad un alta concentrazione di farmaco. Il veicolo può essere un solvente o un mezzo
15 di dispersione acquoso o non acquoso, contenente ad esempio acqua, etanolo, polioli (come glicerolo, glicole propilenico, polietilenglicole e simili), e loro miscele adatte, oli vegetali, come olio d'oliva, ed esteri organici iniettabili, come etil oleato. L'adeguata fluidità può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di un rivestimento come la
20 lecitina, mediante il mantenimento della dimensione delle particelle richiesta nel caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, ad esempio zuccheri, polialcoli come glicerolo, mannitolo, sorbitolo o cloruro di sodio nella composizione. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili
25 può essere ottenuto includendo nella composizione un agente che



ritarda l'assorbimento, ad esempio sali di monostearato e gelatina. Possono essere preparate soluzioni iniettabili sterili incorporando il composto attivo nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di ingredienti ad es. come elencato sopra, 5 come richiesto, seguito da microfiltrazione di sterilizzazione. In generale, le dispersioni sono preparate incorporando il composto attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione di base e gli altri ingredienti richiesti ad es. da quelli sopra elencati. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni sterili iniettabili, esempi di metodi 10 di preparazione sono l'essiccazione sottovuoto e la liofilizzazione che producono una polvere del principio attivo più qualsiasi altro ingrediente desiderato da una sua soluzione sterile precedentemente filtrata.

Le soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate 15 incorporando il composto attivo nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di ingredienti sopra elencati, come richiesto, seguito da microfiltrazione di sterilizzazione. Generalmente, le dispersioni sono preparate incorporando il composto attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione di base 20 e gli altri ingredienti richiesti tra quelli elencati sopra. In caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, esempi di metodi di preparazione sono l'essiccazione sottovuoto e la liofilizzazione, che producono una polvere del principio attivo più qualsiasi altro ingrediente desiderato da una soluzione precedentemente sterile filtrata.

25 *Produzione di anticorpi anti-AXL*



Gli anticorpi per l'uso come gli ADC secondo l'invenzione possono essere preparati in modo ricombinante in una cellula ospite, usando costrutti di acido nucleico, tipicamente sotto forma di uno o più vettori di espressione. In una forma di realizzazione, il costrutto di acido nucleico codifica una o più sequenze illustrate in Tabella 1. In un'ulteriore forma di realizzazione, il vettore di espressione comprende ulteriormente una sequenza di acido nucleico che codifica la regione costante di una catena leggera, una catena pesante o sia la catena leggera sia la catena pesante di un anticorpo, ad es. un anticorpo monoclonale umano IgG1, κ .

L'anticorpo anti-AXL espresso può successivamente essere coniugato ad una porzione come qui descritta. In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo anti-AXL può successivamente essere utilizzato per generare un anticorpo bispecifico come qui descritto, prima della coniugazione.

Il vettore di espressione può essere qualsiasi vettore adatto, inclusi vettori di acido nucleico (una sequenza di acido nucleico comprendente un adeguato set di elementi di controllo di espressione) cromosomici, non cromosomici e sintetici. Esempi di tali vettori includono derivati di SV40, plasmidi batterici, fagi a DNA, baculovirus, plasmidi di lievito, vettori derivati da combinazioni di plasmidi e DNA fagico, e vettori di acido nucleico virale (RNA o DNA). Un acido nucleico che codifica un anticorpo anti-AXL può essere compreso in un vettore nudo ("naked") di DNA o RNA, incluso, ad esempio, un elemento di espressione lineare (come descritto ad esempio in Sykes e Johnson



(1997), un vettore di acido nucleico compattato (come descritto per esempio US 6,077,835 e/o WO 00/70087), un vettore plasmidico come pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vettore di acido nucleico di dimensioni minime di tipo "midge" (come descritto ad esempio in
5 Schakowski et al. (2001)), o come un costrutto di vettore di acido nucleico precipitato, come un costrutto precipitato con fosfato di calcio (come descritto ad esempio in WO 00/46147; Benvenisty e Reshef, 1986; Wigler et al., 1978; e Coraro e Pearson, 1981). Tali vettori di acido nucleico e il loro utilizzo sono ben noti nella tecnica (si vedano ad
10 esempio US 5,589,466 e US 5,973,972).

Il vettore può essere uno adatto all'espressione dell'anticorpo anti-AXL in una cellula batterica. Esempi di tali vettori includono vettori di espressione come BlueScript (Stratagene), vettori pIN (Van Heeke e Schuster, 1989), vettori pET (Novagen, Madison WI) e simili).

15 Un vettore di espressione può anche o in alternativa essere un vettore adatto per l'espressione in un sistema di lievito. Qualsiasi vettore adatto per l'espressione in un sistema di lievito può essere impiegato. Vettori adatti includono, ad esempio, vettori comprendenti promotori costitutivi o inducibili come fattore alfa, alcol ossidasi e PGH
20 (descritto in review in Ausubel et al., 1987, e Grant et al., 1987).

Un costrutto e/o vettore di acido nucleico può anche comprendere una sequenza di acido nucleico che codifica una sequenza di secrezione/localizzazione, che può indirizzare un polipeptide, come una catena nascente di polipeptide, verso lo spazio periplasmatico o nei
25 mezzi di coltura cellulare. Tali sequenze sono note nell'arte e includono i

peptidi “leader” o di segnale di secrezione, sequenze di indirizzamento agli organelli (ad es. sequenze di localizzazione nucleare, segnali di ritenzione all’ER, sequenze di transito mitocondriale, sequenze di transito al cloroplasto), sequenze di ancoraggio/localizzazione alla
5 membrana (ad es. sequenze di trasferimento di arresto, sequenze di ancoraggi GPI), e simili.

In un vettore di espressione, gli acidi nucleici che codificano l'anticorpo anti-AXL possono comprendere o essere associati a qualsiasi promotore, potenziatore (“enhancer”) e altri elementi che facilitano
10 l'espressione adatti. Esempi di tali elementi includono promotori forti di espressione (ad es. promotore/potenziatore di CMV IE umani, nonché promotori di RSV, SV40, SL3-3, MMTV e HIV LTR), sequenze di terminazione poli (A) efficaci, un'origine della replicazione per il prodotto plasmidico in E. coli, un gene di resistenza antibiotica come marcatore
15 di selezione, e/o un sito di clonaggio conveniente (ad esempio un “polilinker”). Gli acidi nucleici possono anche comprendere un promotore inducibile invece di un promotore costitutivo come CMV IE (l'esperto riconoscerà che tali termini sono in realtà descrittori di un grado di espressione genica in determinate condizioni).

20 Il vettore di espressione che codifica l’anticorpo anti-AXL può essere posizionato in e/o consegnato alla cellula ospite o all’animale ospite tramite un vettore virale.

La cellula ospite può essere una cellula ospite eucariotica o procariotica ricombinante, come un transfectoma, che produce un
25 anticorpo anti-AXL come qui definito o una molecola bispecifica



dell'invenzione come qui definita. Esempi di cellule ospiti includono lievito, cellule batteriche e di mammifero, come cellule CHO o HEK o loro derivati. Ad esempio, la cellula può comprendere un acido nucleico stabilmente integrato nel genoma cellulare che comprende una
5 sequenza codificante per l'espressione dell'anticorpo anti-AXL. La cellula può comprendere un acido nucleico non integrato, come un plasmide, un cosmide, fagemide, o elemento di espressione lineare, che comprende una sequenza codificante per l'espressione dell'anticorpo anti-AXL.

10 Il termine "cellula ospite ricombinante" (o semplicemente "cellula ospite"), come qui usato, intende riferirsi a una cellula in cui è stato introdotto un vettore di espressione. Dovrebbe essere inteso che tali termini sono destinati a riferirsi non solo alla cellula soggetto particolare, ma anche alla progenie di tale cellula. Perché alcune
15 modifiche possono verificarsi nelle generazioni successive dovute a mutazione o a influenze ambientali, tale discendenza potrebbe, in effetti, non essere identica alla cellula genitore, ma è ancora inclusa nell'ambito del termine "cellula ospite" come qui utilizzato. Le cellule ospiti ricombinanti includono, per esempio, transfettomi, come cellule
20 CHO, cellule HEK-293, PER.C6, cellule NSO e cellule linfocitiche e cellule procariotiche come E. coli e altri ospiti eucariotici come cellule vegetali e funghi.

Il termine "transfettoma", come qui utilizzato, include le cellule ospiti eucariotiche ricombinanti che esprimono l'anticorpo o un
25 antigene bersaglio, come cellule CHO, PER.C6, cellule NSO, cellule



HEK-293, cellule vegetali o funghi, comprese le cellule di lievito.

In alternativa, l'anticorpo può essere prodotto da un ibridoma preparato da cellule B spleniche murine ottenute da topi immunizzati con un antigene di interesse, ad esempio in forma di cellule che
5 esprimono l'antigene in superficie, o di un acido nucleico codificante una regione extracellulare di AXL. Gli anticorpi monoclonali possono anche essere ottenuti da ibridomi derivati da cellule che esprimono anticorpi di esseri umani immunizzati o di mammiferi non umani come conigli, ratti, cani, primati, ecc.

10 Gli anticorpi umani possono essere generati usando topi transgenici o transcromosomici, ad es. Topi HuMAb, che portano parti del sistema immunitario umano anziché del sistema murino. Il topo HuMAb contiene un minilocus umano genetico delle immunoglobuline che codifica sequenze immunoglobuliniche di catena pesante (μ e γ) e
15 leggera κ umane non riarrangiate, insieme a mutazioni mirate che inattivano i loci della catene μ e κ endogeni (Lonberg et al., 1994a). Di conseguenza, i topi innescano una risposta anticorpale umana dopo l'immunizzazione, i transgeni delle catene pesante e leggera umane introdotti subiscono un cambio di classe e mutazione somatica per
20 generare anticorpi monoclonali IgG, κ umani ad alta affinità (Lonberg et al., 1994b; Lonberg and Huszar, 1995; Harding e Lonberg, 1995). La preparazione dei topi HuMAb è descritta in dettaglio in Taylor et al., 1992; Chen et al., 1993; Tuailleon et al., 1994; e Fishwild et al., 1996. Vedi anche US 5,545,806; NOI 5,569,825; US 5,625,126; US 5,633,425;
25 US 5,789,650; US 5,877,397; US 5,661,016; US 5,814,318; US



GEN014ESM

5,874,299; US 5,770,429; US 5,545,807; WO 98/024884; WO 94/025585; WO 93/001227; WO 92/022645; WO 92/003918; e WO 01/009187. Gli splenociti da questi topi transgenici possono essere utilizzati per generare ibridomi che secernono anticorpi monoclonali

5 umani secondo tecniche ben note. Inoltre, gli anticorpi umani possono essere generati da topi o ratti transgenici per produrre anticorpi chimerici di umano-di ratto che possono essere utilizzati come fonte per la produzione ricombinante di anticorpi monoclonali completamente umani.

10 Inoltre, gli anticorpi umani possono essere identificati attraverso tecnologie di tipo “display”, tra cui, senza limitazione, display fagico, display retrovirale, display ribosomiale, display mammifero, display di lievito e altre tecniche note nell'arte e le molecole risultanti possono essere soggette a ulteriore maturazione, come ad esempio

15 maturazione di affinità, poiché le tecniche sono ben note nell'arte.

Tabella 4 – Sequenze

SEQ ID NO:	Nome	Sequenza amminoacidica	Commenti
1	107 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMNWWVRQAPGK GLEWVST TSGSGAST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC AKIWIAFDI WGQGTMTVSS	Ab che si lega al dominio Ig1 di HCo12-BalbC
2	107 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQ YGSSPYTF GQGTKEIK	
3	140 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMTWVRQAPGK GLEWVSA ISIGAST FYADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRA EDTAVYFC RGYSGYVDAFDI WGQGTMTVSS	
4	140 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISNW LAWYQQKPEKA PKSLIY AAS LQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC Q QNSYPLT FGGGTKVEIK	
5	148 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMTWVRQAPGK	Ab che si lega

GEN014ESM

		GLEWVSAI SISGGST FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC RGYSGYVYDAFD FWGQGMVTVSS	al dominio Ig2 di HCo12- BalbC
6	148 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISNW LAWYQQKPEKA PKSLIY AAS SLOSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC Q QYNSYPLT FGGGTKVEIK	
7	154 VH	EVQLLDSEGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGK GLEWVSAI SIGGGNA YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA AADTAVYYC AKPGFIMVRG PLDYWGQ GALVTVSS	Ab che si lega al dominio FN1 di HCo12- BalbC
8	154-M103L VH	EVQLLDSEGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGK GLEWVSAI SIGGGNA YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA AADTAVYYC AKPGFILVRG PLDYWGQ GALVTVSS	
9	154 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVNSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC Q QYGSSPYT FGGQTKLEIK	
10	171 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGK GLEWVSDI SVSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA AEDTAVYYC AKEGYIWFGE SLSYAFDIWGQ GMVTVSS	Ab che si lega al dominio Ig2 di HCo17- BalbC
11	171 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC Q YGRSFT FGPGTKVDIK	
12	172 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGK GLEWVSDI SVSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA AEDTAVYYC AKEGYIWFGE SLSYAFDIWGQ GMVTVSS	
13	172 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC Q YGRSFT FGPGTKVDIK	
14	181 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGK GLEWVSDI SVSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRA AEDTAVYYC AKEGYIWFGE SLSYAFDIWGQ GMVTVSS	
15	181 VH	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC Q YGRSFT FGPGTKVDIK	
16	183 VH	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVY GGFSGYY WSWIRQPPGK GLEWIGE INQSGST NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTSVYYC ASGNWDHFFD YWGQGLTVTVSS	Ab che si lega al dominio FN1 di HCo17- BalbC
17	183-N52Q VH	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVY GGFSGYY WSWIRQPPGK GLEWIGE IQSGST NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTSVYYC ASGNWDHFFD YWGQGLTVTVSS	
18	183 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRAS QGISSW LAWYQHKPGKA PKLLIY ATS SLOSGVTSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC Q AKSFPWT FGGQTKVEIK	

GENO14ESM

19	187 VH	QVPLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYHWSWIRQPPGK GLEWIGEISHSGRTNYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCASFITMIRGTIITHFDYWGQGLTVTVSS	
20	187 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QYHSYPYTFGQGTKLEIK	
21	608-01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGRIIPIFGIANYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRA EDTAVYYCARRGDYGGSPDVFDIWGQGTMTVTVSS	
22	608-01 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSYTFGQGTKLEIK	
23	610-01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGRIIPIFGIANYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRA EDTAVYYCARRGNYYGGSPDVFDIWGQGTMTVTVSS	
24	610-01 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSYTFGQGTKLEIK	
25	613 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAINWVRQAPG QGLEWMGRIIPIFGIVNYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRGNYYGGSPDVFDIWGQGTMTVTVSS	Ab che si lega al dominio Ig1 di HCo20
26	613 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSYTFGQGTKLEIK	
27	613-08 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAINWVRQAPG QGLEWMGRIIPIFGIVNYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRGNYYGGSPDVFDIWGQGTMTVTVSS	
28	613-08 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQR SNWLTFGGGTKVEIK	
29	620-06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGRIIPIFGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARRGNYYGGSPDVFDIWGQGTMTVTVSS	
30	620-06 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSYTFGQGTKLEIK	
31	726 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIDGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEISHSGRTNYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVAAAD TAVYYCARFITMIRGAIITHFDYWGQGALVTVSS	Ab che si lega al dominio FN2 di HCo17- BalbC
32	726-M101L VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIDGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEISHSGRTNYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVAAAD	

GENO14ESM

		TAVYYC <u>ARFITLIRGAIITHFDY</u> WGQGalVTVSS	
33	726 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPEKAPKSLIYA <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QYHSYPYTFGQGTKLEIK</u>	
34	733 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <u>GFSFSTYAM</u> HWWVRQAPGKGLEWVAVISYDGDNKYSADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARGRKLGI</u> DAFDIWGQGTMTVSS	Ab che si lega al dominio FN1 di HCo17-BalbC
35	733 VL	AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRAS <u>QGISSA</u> LAWYQQKPGKAPKLLIYD <u>ASS</u> LESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC <u>QQFNSYPFTFGPGTKVDIK</u>	
36	107 VH CDR1	GFTFSSYA	
37	107 VH CDR2	TSGSGAST	
38	107 VH CDR3	AKIWIAFDI	
39	107 VL CDR1	QSVSSSY	
	107 VL CDR2	GAS	
40	107 VL CDR3	QQYGSSPYT	
41	140 VH CDR1	GFTFSSYA	
42	140 VH CDR2	ISISGAST	
43	140 VH CDR3	RGYSGYVYDAFDI	
44	140 VL CDR1	QGISNW	
	140 VL CDR2	AAS	
45	140 VL CDR3	QQYNSYPLT	
46	148 VH CDR1	GFTFSSYA	
47	148 VH CDR2	ISISGGST	
48	148 VH CDR3	RGYSGYVYDAFDF	
49	148 VL CDR1	QGISNW	
	148 VL CDR2	AAS	
50	148 VL CDR3	QQYNSYPLT	
51	154 VH CDR1	GFTFSSYA	
52	154 VH CDR2	ISIGGNA	
53	154 VH CDR3	AKPGFIMVRGPLDY	
54	154-M103L VH CDR3	AKPGFILVRGPLDY	
55	154 VL CDR1	QSVNSY	
	154 VL CDR2	GAS	
56	154 VL CDR3	QQYGSSPYT	
57	171 VH CDR1	GFTFSSYA	
58	171 VH CDR2	ISVGGST	
59	171 VH CDR3	AKEGYIWFGEISLYAFDI	
60	171 VL CDR1	QSVSSSY	
	171 VL CDR2	GAS	
61	171 VL CDR3	QQYGRSFT	
62	172 VH CDR1	GFTFSNYA	

GEN014ESM

63	172 VH CDR2	ISVSGGST	
64	172 VH CDR3	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
65	172 VL CDR1	QSVSSSY	
	172 VL CDR2	GAS	
66	172 VL CDR3	QQYGRSFT	
67	181 VH CDR1	GFTFSSYA	
68	181 VH CDR2	ISVSGGST	
69	181 VH CDR3	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
70	181 VL CDR1	QSVSSSY	
	181 VL CDR2	GAS	
71	181 VL CDR3	QQYGRSFT	
72	183 VH CDR1	GGSFSGYY	
73	183 VH CDR2	INQSGST	
74	183-N52Q VH CDR2	IQQSGST	
75	183 VH CDR3	ASGNWDHFFDY	
76	183 VL CDR1	QGISSW	
	183 VL CDR2	ATS	
77	183 VL CDR3	QQAKSFPWT	
78	187 VH CDR1	GGSFSGYH	
79	187 VH CDR2	ISHSGRT	
80	187 VH CDR3	ASFITMIRGTIITHFDY	
81	187 VL CDR1	QGISSW	
	187 VL CDR2	AAS	
82	187 VL CDR3	QQYHSYPYT	
83	608-01 VH CDR1	GGTFSSYA	
84	608-01 VH CDR2	IPIFGIA	
85	608-01 VH CDR3	ARRGDYYGSGSPDVFDI	
86	608-01 VL CDR1	QSVSSSY	
	608-01 VL CDR2	GAS	
87	608-01 VL CDR3	QQYGSSYT	
88	610-01 VH CDR1	GGTFSSYA	
89	610-01 VH CDR2	IPIFGIA	
90	610-01 VH CDR3	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
91	610-01 VL CDR1	QSVSSSY	
	610-01 VL CDR2	GAS	
92	610-01 VL CDR3	QQYGSSYT	
93	613 VH CDR1	GGTFSSYA	
94	613 VH CDR2	IPIFGIV	
95	613 VH CDR3	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
96	613 VL CDR1	QSVSSSY	
	613 VL CDR2	GAS	
97	613 VL CDR3	QQYGSSYT	
98	613-08 VH CDR1	GGTFSSYA	

GEN014ESM

99	613-08 VH CDR2	IPIFGIV	
100	613-08 VH CDR3	ARRGNYGSGSPDVFDI	
101	613-08 VL CDR1	QSVSSY	
	613-08 VL CDR2	DAS	
102	613-08 VL CDR3	QQRSNWLT	
103	620-06 VH CDR1	GGTFSSYA	
104	620-06 VH CDR2	IPIFGIA	
105	620-06 VH CDR3	ARRGNYGSGSPDVFDI	
106	620-06 VL CDR1	QSVSSY	
	620-06 VL CDR2	GAS	
107	620-06 VL CDR3	QQYGSSYT	
108	726 VH CDR1	GGSFSGYY	
109	726 VH CDR2	ISHSGRT	
110	726 VH CDR3	ARFITMIRGAIITHFDY	
111	726-M101L VH CDR3	ARFITLIRGAIITHFDY	
112	726 VL CDR1	QGISSW	
	726 VL CDR2	AAS	
113	726 VL CDR3	QQYHSYPYT	
114	733 VH CDR1	GFSFSTYA	
115	733 VH CDR2	ISYDGDNK	
116	733 VH CDR3	ARGRKLIGIDAFDI	
117	733 VL CDR1	QGISSA	
	733 VL CDR2	DAS	
118	733 VL CDR3	QQFNSYPFT	
119	VH CDR2 per dominio Ig2	ISISGXST – in cui X è A o G	
120	VH CDR3 per dominio Ig2	RGYSGYVYDAFDX – in cui X è I o F	
121	VH CDR1 per dominio FN2	GGSFSGYX – in cui X è H o Y	
122	VH CDR3 per dominio FN2	AX1FITMIRGX2IITHFDY – in cui X1 è S o R; e X2 è T o A	
123	VH CDR1 per dominio FN1	GFTFSXYA – in cui X è S o N	
124	VH CDR2 per dominio FN1	ISVSGGST	
125	VH CDR3 per dominio FN1	AKEGYIWFGEISLSYAFDI	
126	VH CDR2 per dominio Ig1	IPIFGIX – in cui X è A o V	
127	VH CDR3 per dominio Ig1	ARRGXYYGSGSPDVFDI – in cui X è D o N	
128	VL CDR1 per	QSVXSSY – in cui X è S o delete	

GENO14ESM

	dominio Ig1		
	VL CDR2 per dominio Ig1	XAS – in cui X è D o G	
129	VL CDR3 per dominio Ig1	QQX1X2X3X4X5T – in cui X1 è R o Y; X2 è S o G; X3 è N o S; X4 è W o S; e X5 è L o Y	
130	Proteina umana AXL (Swissprot P30530)	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCLQVQGEPEVHWLRDQIQLADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLL WLQDAVPLATAPGHGPRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVA VKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSER ESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMA DIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIY NGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMW EIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSR CWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLC PST TPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
131	AXL di Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQ TEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGEPEVWLRDQ QIQLADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLRISALQLSDAGEYQ CMVHLEGRTFVSQPGFVGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSC QAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSQTPLNKTSSFS CEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPG LSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVIWLGKSDPPEDPLTQVSVPPH QLRLEKLLPHTPYHIRISCSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPP ENVSAMRNGSQVLVRWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEV LMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPL EPWRPGQGQPLHHLVSEPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACV LILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTE ATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQ LNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVM RLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYL PTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV CVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSD VWSFGVTMW EIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADC LDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEI	

GENO14ESM

		LYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVH PAGRYVLCSTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
132	AXL di Homo sapiens – dominio Ig1 di Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLSQTPGLNKTSSFSCAEHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCT QAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFG VTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR YVLCSTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
133	AXL di Homo sapiens – dominio Ig2 di Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLSQTPGLNKTSSFSCAEHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCT QAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVVSFG VTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR YVLCSTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
134	AXL di Homo	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQAEESPFVGN	

GENO14ESM

	sapiens – dominio FN1 di Mus musculus	PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEVDLL WLQDAVPLATAPGHGQPSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQRP HHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNL QAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTP YHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQA FVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL LQGDGVSNTLVCVAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPGQAQPV HQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKE TRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEK LRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDS ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWVSG VTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILVYN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR YVLCPSTTSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
135	AXL di Homo sapiens – dominio FN2 di Mus musculus	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEVDLL WLQDAVPLATAPGHGQPSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNG SQVLVRWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEVLMDIGLTREVT LELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWVSLPVPLEPWRPQGQQP LHHLVSEPPRAFVSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKE KLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAV KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMAD IASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYN GDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWVSGVTMWEI ATRQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILVYNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSTT PSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
136	511 VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSAA SGFTFSSY AMNWWVRQAPGK GLEWVSG ISGSGGHT YHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC AKDRYDILTGYYNLLDY WGQGLTIVTSS	Ab che si lega al dominio Ig2
137	511 VH CDR1	GFTFSSYA	

GEN014ESM

138	511 VH CDR2	ISGSGGHT	
139	511 VH CDR3	AKDRYDILTGYYNLLDY	
140	511 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPEEAP KSLIY <u>AAS</u> SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YNSYPLT</u> FGGGAKVEIK	
141	511 VL CDR1	QGISSW	
	511 VL CDR2	AAS	
142	511 VL CDR3	QQYNSYPLT	
143	061 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTGYGISWVRQAPGQ GLEWIGWISAYNGNTNYVQNLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARDHISMLRGIIRNYWGQGTLVTVSS	Ab che si lega al dominio Ig1
144	061 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRS SWPRLTFGGGKVEIK	
145	137 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSRYAISWVRQAPGQ GLEWMGRIIPVIGIANYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAREAGYSSSWYAEYFQHWGQGLVTVSS	
146	137 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGFPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPYTFGGGKLEIK	
147	AXL di scimmia Cynomolgus (GenBank number HB387229.1)	AWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTQAEESPFVGNP GNITGARGLTGLRCLQVQGEPPVHWLRDQGILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFV SQPGYVGLLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDL LWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGV TSRTATITVLPQQPRNLHLSRQPTTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRGLSLHPHTP YHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQ AFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL ELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQP VHQLVKETSAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKE KLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDSILKAV KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMAD IASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYN GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEI ATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELRELENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQLDPKDCSCLTSAEVHPAGRYVLCPSTA PSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
148- 153		Si veda Esempio 3	

La presente invenzione è ulteriormente illustrata dai seguenti esempi che non devono essere interpretati come ulteriori limitanti.

ESEMPI

Esempio 1 – Immunizzazione e generazione di anticorpi contro

5 *AXL.*

Costrutti di espressione per AXL

Sono stati generati i seguenti costrutti ottimizzati per codone per l'espressione di varie varianti di AXL a lunghezza intera: AXL (n. di accesso di Genbank NP_068713.2) umano (*Homo sapiens*), AXL
10 chimerico umano-scimmia cynomologus in cui il dominio extracellulare umano (ECD) è stato sostituito con l'ECD di AXL (conversione di accesso di Genbank HB387229.1; aa 1-447) di scimmia cynomolgus (*Macaca fascicularis*), AXL chimerico umano-murino in cui l'ECD umano è stato sostituito con l'ECD di AXL (n. di accesso di Genbank
15 NP_033491.2; aa 1-441) di topo (*Mus musculus*), AXL chimerico umano-murino in cui il dominio I simile a Ig umano (aa 1-134, qui definito anche "dominio Ig1") è stato sostituito con il dominio I simile a Ig di AXL murino, AXL chimerico umano-murino in cui il dominio II simile a Ig umano (aa 148-194, anche qui definito "dominio Ig2") è stato sostituito
20 dal dominio II simile a Ig di AXL murino, ALX chimerico umano-murino in cui il dominio I simile a FNIII umano (aa 227-329, anche qui definito "dominio FN1") è stato sostituito con il dominio I simile a FNIII di AXL murino, AXL chimerico umano-murino in cui il dominio II simile a FNIII umano (aa 340-444, anche qui definito "dominio FN2") è stato sostituito
25 dal dominio II simile a FNIII di AXL murino. Inoltre, sono stati generati i



seguenti costrutti ottimizzati per codone per varie varianti di ECD di AXL: il dominio extracellulare (ECD) di AXL umano (aa 1-447) con un tag di His al C-terminale (AXLECDHis), il dominio II simile a FNIII di AXL umano (aa 327-447) con un peptide segnale all'N-terminale e un tag di His al C-terminale (AXL-FN2ECDHis) e i domini Ig1 e Ig2 di AXL umano (aa 1-227) con un tag di His al C-terminale (AXL-Ig12ECDHis).

I costrutti contenevano idonei siti di restrizione per il clonaggio e una sequenza ottimale di Kozak (GCCGCCACC) (Kozak et al., 1999). I costrutti sono stati clonati nel vettore di espressione di mammifero pcDNA3.3 (Invitrogen).

Espressione di AXL nelle cellule EL4

Le cellule EL4 erano stabili trasfettate con il vettore pcDNA3.3 contenente la sequenza codificante AXL umano a lunghezza intera e sono stati selezionati cloni stabili dopo la selezione con l'agente antibiotico, G418, (geneticina).

Purificazione di AXL con tag di His

AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis e AXL-Ig12ECDHis sono stati espressi in cellule HEK-293F. Il tag di His consente la purificazione con cromatografia di affinità con metalli immobilizzati. In questo processo, un chelante fissato sulla resina cromatografica è caricato con cationi Co^{2+} . I surnatanti contenenti le proteine con tag di His sono stati incubati con la resina in modalità batch (ovvero soluzione). La proteina con tag di His si lega fortemente alle biglie di resina, mentre le altre proteine presenti nel surnatante della cultura non si legano o si legano debolmente rispetto alle proteine con tag di His. Dopo l'incubazione, le

biglie sono state recuperate dal surnatante e impaccate in una colonna. La colonna è lavata per rimuovere le proteine legate debolmente. Le proteine con tag di His fortemente legate sono poi eluite con un tampone contenente imidazolo, che compete con il legame di His a Co^{2+} .

5 L'eluente è rimosso dalla proteina mediante scambio di tampone su una colonna di dissalazione.

Immunizzazione

Gli anticorpi IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-726 sono stati derivati dalle seguenti
10 immunizzazioni: topi transgenici (Medarex, San Jose, CA, USA) HCo12-BalbC (IgG1-AXL-107), HCo17-BalbC (IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726) e HCo20 (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-613) che sono stati immunizzati, in modo alternato, per via intraperitoneale (IP) con 20 μg della proteina AXLECDHis (IgG1-AXL-511, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-183) *et al.*, 20 μg
15 di AXL-FN2ECDHIS più 20 μg di AXL-Ig12ECDHIS (IgG1-AXL-726) o 20 μg di AXL-Ig12ECDHIS (IgG1-AXL-107) e per via sottocutanea (SC; alla base della coda) con la stessa proteina, con un intervallo di 14 giorni. In totale sono state eseguite 8 immunizzazioni: 4 immunizzazioni IP e 4 immunizzazioni SC. Per la maggior parte delle immunizzazioni, la prima
20 immunizzazione è stata eseguita in adiuvante di Freund completo (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e tutte le successive immunizzazioni in adiuvante di Freund incompleto (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). L'anticorpo IgG1-AXL-183 è stato derivato da immunizzazioni che erano tutte eseguite nel sistema
25 adiuvante Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



GEN014ESM

Gli anticorpi IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-171 e IgG1-AXL-733 sono stati derivati dalle seguenti immunizzazioni: i topi transgenici (Medarex, San Jose, CA, USA) HCo12-BalbC (IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148), HCo17-BalbC (IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-733) e HCo20-BalbC (IgG1-AXL-171) sono stati immunizzati con 20 µg della proteina AXLECDHis in CFA. Successivamente, i topi sono stati immunizzati, in modo alternato, per via intraperitoneale (IP) con cellule EL4 trasfettate con AXL umano a lunghezza intera in PBS e per via sottocutanea (SC; alla base della coda) con la proteina AXLECDHis in IFA, con un intervallo di 14 giorni.

I topi con almeno due titoli sequenziali di anticorpi specifici per AXL di 200 (diluizioni sieriche di 1/200) o superiori, rilevati nel saggio di screening FMAT specifico per antigene come descritto di seguito, sono stati potenziati ("boosted") 3-4 giorni prima della fusione (10 µg di proteina derivata da AXL in PBS iniettato per via endovenosa).

Saggio di screening omogeneo specifico per antigene

La presenza di anticorpi anti-AXL nei sieri di topi immunizzati o nel surnatante di coltura di ibridoma o trasfettoma HuMab (anticorpo monoclonale umano) è stata determinata mediante saggi di screening omogenei specifici per antigeni utilizzando la "Fluorometric Micro volume Assay Technology" (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per questo, sono stati utilizzati due diversi design di test con combinazioni di saggi basati su 4 o 8 cellule.

Il design del test di saggio basato su 4 cellule è stato utilizzato per il test dei sieri di topi immunizzati e come test di screening primario



per il surnatante di coltura di ibridoma o transfettoma. Nel design di test di saggio a 4, i campioni sono stati analizzati per il legame degli anticorpi umani alle cellule A431 (DSMZ) e MDA-MB-231 (entrambi che esprimono AXL sulla superficie cellulare) nonché per il legame alle
5 cellule TH1021-AXL (cellule HEK-293F che esprimono transientemente AXL umano a lunghezza intera; prodotto come descritto sopra) e a cellule selvatiche (“wild-type”) HEK293 (controllo negativo che non esprime AXL), rispettivamente.

I campioni di surnatante di coltura di ibridoma o transfettoma
10 sono stati inoltre sottoposti a un design di test basato su 8 cellule. Nel design di test di saggio a 8, i campioni sono stati analizzati per il legame degli anticorpi umani a cellule TH1021-hAXL (cellule HEK-293F che esprimono transientemente l'AXL umano), cellule TH1021-cAXL (cellule HEK-293F che esprimono transientemente chimere di AXL umano-
15 cynomologus in cui l'ECD umano era stato sostituito con l'ECD di AXL di scimmia cynomolgus), cellule TH1021-mAXL (cellule HEK-293F che esprimono transientemente chimere di AXL umano-murino in cui l'ECD umano era stato sostituito con l'ECD di AXL murino), cellule TH1021-mIg1 (cellule HEK-293F che esprimono transientemente l'AXL umano
20 con il dominio I simile a Ig che è sostituito dal dominio I simile a Ig di AXL murino), cellule TH1021-mIg2 (cellule HEK-293F che esprimono transientemente AXL umano con dominio II simile a Ig che è sostituito dal dominio II simile a Ig di AXL murino), cellule TH1021-mFN1 (cellule HEK-293F che esprimono transientemente AXL umano con il dominio I
25 simile a FNIII che è sostituito dal dominio I simile a FNIII di AXL



murino), cellule TH1021-mFN2 (cellule HEK-293F che esprimono
transientemente AXL umano con il dominio II simile a FNIII che è
sostituito dal dominio II simile a FNIII di AXL murino) e cellule
selvatiche HEK293 (controllo negativo che non esprime AXL),
5 rispettivamente.

Sono stati aggiunti i campioni alle cellule per consentire il
legame ad AXL. Successivamente, è stato rilevato il legame di HuMab
usando un coniugato fluorescente (Fc gamma di IgG di capra anti-
umano-DyLight649; Jackson ImmunoResearch). L'anticorpo A0704P
10 murino umanizzato specifico per AXL (prodotto nelle cellule HEK-293F)
è stato usato come controllo positivo e il siero in pool HuMab-murino e
“ChromPure Human IgG”, molecola intera (Jackson ImmunoResearch),
rispettivamente, sono stati usati come controlli negativi. I campioni
sono stati analizzati utilizzando un “Applied Biosystem 8200 Cellular
15 Detection System” (8200 CDS) e la fluorescenza media è stata usata
come lettura. I campioni sono stati dichiarati positivi quando i conteggi
erano superiori a 50 e conteggi x fluorescenza era almeno tre volte
superiore al controllo negativo.

Generazione di ibridoma HuMab

20 Il topo HuMab con sufficiente sviluppo di titoli specifici per
l'antigene (descritto sopra) è stato sacrificato e sono stati raccolti la
milza e i linfonodi che fiancheggiavano l'aorta addominale e la vena
cava. La fusione delle cellule di splenociti e dei linfonodi a una linea
cellulare di mieloma murina (cellule SP2.0) è stata eseguita mediante
25 elettrofusione usando “CytoPulse CEF 50 Electrofusion System”



(Cellestis, Parigi, Francia), essenzialmente secondo le istruzioni del produttore. Successivamente, i pozzetti primari sono stati subclonati utilizzando il sistema "ClonePix" (Genetix, Hampshire, Regno Unito). A tal fine, specifici ibridomi dei pozzetti primari sono stati impiantati in un mezzo semisolido composto dal 40% di "CloneMedia" (Genetix, Hampshire, Regno Unito) e dal 60% di mezzo completo HyQ 2x (Hyclone, Waltham, Stati Uniti). I sotto-cloni sono stati nuovamente testati secondo il saggio di legame specifico per l'antigene come descritto sopra e analizzati usando il sistema IsoCyte (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). I livelli di IgG sono stati misurati usando Octet (Fortebio, Menlo Park, USA) al fine di selezionare il miglior clone di produzione per pozzetto primario per un'ulteriore espansione.

Le ulteriori espansione e coltura dei risultanti ibridomi HuMab sono state eseguite in base a protocolli standard (ad es. come descritto in Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. e Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc. et al., 2006). I cloni derivati da questo processo sono stati designati PC1021.

Spettrometria di massa degli anticorpi purificati

Piccole aliquote da 0,8 ml di surnatante di ibridoma contenente anticorpi sono state purificate dallo stadio di 6 pozzetti o di Hyperflask utilizzando colonne PhyTip contenenti resina di Proteina G (PhyNexus Inc., San Jose, USA) su una stazione di lavoro Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, Stati Uniti). Le colonne PhyTip sono state utilizzate secondo le istruzioni del produttore, ma i tamponi



sono stati sostituiti da: tampone di legame PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands) e tampone di eluizione glicina 0,1 M-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germania). Dopo la purificazione, i campioni sono stati neutralizzati con 2M Tris-HCl pH 9,0 (Sigma-
5 Aldrich, Zwijndrecht, Paesi Bassi). In alternativa, in alcuni casi, sono stati purificati volumi maggiori di surnatante di coltura mediante cromatografia su colonna di affinità con proteina A.

Dopo la purificazione, i campioni sono stati collocati in una piastra da 384 pozzetti (Waters, piastra da pozzetti quadrata da 100 µl, parte#186002631). I campioni sono stati deglicosilati durante la notte a
10 37°C con N-glicosidasi F. È stato aggiunto DTT (15 mg/ml) (1 µl/pozzetto) e incubato per 1 ora a 37°C. I campioni (5 o 6 µl) sono stati dissalati su un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) con una colonna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1x 50 mm a 60°C. Acqua MQ e acetonitrile per
15 LC-MS (Biosolve, n. Cat n.01204101, Valkenswaard, Paesi Bassi) con entrambi acido formico 0,1% (Fluka, CAT n. 56302, Buchs, Germania), sono stati usati come eluente A e B, rispettivamente. Gli spettri di massa di ionizzazione elettrospray a tempo di volo sono stati registrati online su uno spettrometro di massa micrOTOF™ (Bruker, Brema,
20 Germania) che opera in modalità di ioni positivi. Prima dell'analisi, è stata calibrata una scala di 900-3000 m/z con “ES tuning mix” (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Gli spettri di massa sono stati deconvoluti con il software DataAnalysis™ v.3.4 (Bruker) utilizzando l'algoritmo Maximal Entropy cercando pesi molecolari tra 5 e 80 kDa.

25 Dopo la deconvoluzione, le masse delle catene pesanti e



leggere risultanti (in condizioni riducenti) per tutti i campioni sono state confrontate per trovare anticorpi duplicati. Nel confronto delle catene pesanti, è stata presa in considerazione la possibile presenza di varianti di lisina al C-terminale. Ciò ha prodotto un elenco di anticorpi unici, dove unico è definito come unica combinazione di catene pesanti e leggere. Nel caso fossero stati trovati anticorpi duplicati, sono stati utilizzati i risultati di altri test per decidere quale anticorpo fosse il materiale migliore con cui continuare gli esperimenti.

Analisi di sequenza dei domini variabili dell'anticorpo contro

10 AXL e clonaggio in vettori di espressione

L'RNA totale è stato preparato da cellule di ibridoma da $0,2$ a 5×10^6 e il DNA complementare-5'-RACE (cDNA) è stato preparato da 100 ng di RNA totale, utilizzando il kit "SMART RACE cDNA Amplification" (Clontech), secondo le istruzioni del produttore. Le regioni codificanti VH e VL sono state amplificate mediante PCR e clonate direttamente, in "frame", nei vettori di espressione pGlf e pKappa, mediante clonaggio indipendente dalla ligazione (Aslanidis, C. e P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74). Per ciascun anticorpo, sono stati sequenziati 12 cloni VL e 12 cloni VH. Le sequenze risultanti sono mostrate nella Tabella 4. Le sequenze di CDR sono state definite in base a IMGT (Lefranc et al., 1999 e Brochet, 2008). I cloni con un corretto "Open Reading Frame" (ORF) sono stati selezionati per ulteriori studio ed espressione. I vettori di tutte le combinazioni di catene pesanti e catene leggere che sono state trovate sono state transientemente co-esprese in cellule FreestyleTM 293-F usando 293



fectina.

Per gli anticorpi IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726, sono state generate le seguenti varianti con mutazioni puntiformi nei domini variabili: IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q e
5 IgG1-AXL-726-M101L. I mutanti sono stati generati mediante mutagenesi sito-diretta usando il kit di mutagenesi Quickchange II (Stratagene).

Anticorpi di controllo contro AXL

In alcuni degli Esempi, è stato utilizzato un anticorpo di
10 confronto contro AXL (IgG1-YW327.6S2) che è stato precedentemente descritto (EP 2 220 131, U3 Pharma; WO 2011/159980, Genentech). Le sequenze VH e VL per questi anticorpi specifici contro AXL sono state clonate nei vettori di espressione pGlf e pKappa.

Anticorpo b12

15 In alcuni degli esempi l'anticorpo b12, un anticorpo specifico contro gp120 (Barbas, 1993) è stato usato come controllo negativo.

Espressione

Gli anticorpi sono stati espressi come IgG1, κ . Le miscele di DNA plasmidico codificanti sia la catene pesanti sia le catene leggere di
20 anticorpi sono state transientemente trasfettate in cellule Freestyle HEK293F (Invitrogen, US) usando 293 fectina (Invitrogen, US) essenzialmente come descritto dal produttore.

Purificazione degli anticorpi

Il surnatante di coltura è stato filtrato su filtri senza uscita da
25 0,2 μ m, caricato su colonne MabSelect SuRe da 5 mL (GE Health Care)



ed eluito con 0,1 M di sodio citrato-NaOH, pH 3. L'eluato è stato immediatamente neutralizzato con 2M Tris-HCl, pH 9 e dializzato durante la notte a NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B.Braun). In alternativa, successivamente alla purificazione, l'eluato è stato caricato su una colonna di dissalazione HiPrep e l'anticorpo è stato scambiato in un tampone NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B.Braun). Dopo la dialisi o lo scambio di tampone, i campioni sono stati filtrati sterili su filtri senza uscita da 0,2 µm. La purezza è stata determinata mediante SDS-PAGE e la concentrazione di IgG è stata misurata utilizzando "Octet" (Fortebio, Menlo Park, USA). Gli anticorpi purificati sono stati conservati a 4°C.

L'anticorpo IgG1-AXL-511 è stato generato con il seguente metodo:

Costrutti di espressione per AXL

Sono stati generati i seguenti costrutti ottimizzati per codone per l'espressione di varie varianti di AXL a lunghezza intera: AXL (n. di accesso di Genbank NP_068713.2) umano (*Homo sapiens*), AXL chimerico umano-scimmia cynomolgus in cui il dominio extracellulare umano (ECD) è stato sostituito con l'ECD di AXL (conversione dell'accesso di Genbank HB387229.1; aa 1-447) di scimmia cynomolgus (*Macaca fascicularis*), AXL chimerico umano-murino in cui l'ECD umano è stato sostituito con l'ECD di AXL (accesso di Genbank NP_033491.2; aa 1-441) murino (*Mus musculus*), AXL chimerico umano-murino in cui il dominio I simile a Ig umano (aa 1-147, qui definito anche "dominio Ig1") è stato sostituito con il dominio I simile a Ig di AXL



murino, AXL chimerico umano-murino in cui il dominio II simile a Ig umano (aa 148-227, qui definito anche "dominio Ig2") è stato sostituito dal dominio II simile a Ig di AXL murino, ALX chimerico umano-murino in cui il dominio I simile a FNIII umano (aa 228-326, qui definito anche "dominio FN1") è stato sostituito con il dominio I simile a FNIII di AXL murino, AXL chimerico umano-murino in cui il dominio II simile a FNIII umano (aa 327-447, qui definito anche "dominio FN2") è stato sostituito dal dominio II simile a FNIII di AXL murino. Inoltre, i seguenti costrutti ottimizzati per codone sono stati generati per varie varianti di ECD di AXL: il dominio extracellulare (ECD) di AXL umano (aa 1-447) con un tag di His al C-terminale (AXLECDHis), il dominio II simile a FNIII di AXL umano (aa 327-447) con un peptide segnale all'N-terminale e un tag di His al C-terminale (AXL-FN2ECDHis) e i domini Ig1 e Ig2 dell'AXL umano (aa 1-227) con un tag di His al C-terminale (AXL-Ig12ECDHis).

I costrutti contenevano idonei siti di restrizione per il clonaggio e una sequenza ottimale di Kozak (GCCGCCACC) (Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208). I costrutti sono stati clonati nel vettore di espressione di mammiferi pcDNA3.3 (Invitrogen).

Espressione di AXL in cellule EL4

Cellule EL4 erano stabili trasfettate con il vettore pcDNA3.3 contenente la sequenza codificante AXL umano a lunghezza intera e i cloni stabili sono stati selezionati dopo la selezione con l'agente antibiotico, G418, (geneticina).

Purificazione di AXL con tag di His

AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis e AXL-Ig12ECDHis sono stati



espressi in cellule HEK293F e purificati con cromatografia di affinità con metalli immobilizzati.

Immunizzazione

Il materiale da 4 topi transgenici esprimenti sequenze geniche
5 di anticorpi umani è stato utilizzato per la selezione degli anticorpi. Sono stati scelti topi immunizzati con vari protocolli di immunizzazione e con varie risposte anticorpali e che producevano vari numeri di anticorpi dal tradizionale processo di ibridoma. Il topo A (3,5% “hits” nel processo di ibridoma) era un topo transgenico HCo17- BALB/c (Bristol-
10 Myers Squibb, Redwood City, CA, USA) è stato immunizzato, in modo alternato, per via intraperitoneale (IP) con 20 µg di AXL-FN2ECDHIS più 20 µg di AXL-Ig12ECDHis) e per via sottocutanea (SC) alla base della coda) con la stessa proteina, con un intervallo di 14 giorni. In totale sono state eseguite 8 immunizzazioni: 4 immunizzazioni IP e 4
15 immunizzazioni SC. Per la maggior parte delle immunizzazioni, la prima immunizzazione è stata eseguita in adiuvante di Freund completo (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e tutte le successive immunizzazioni in adiuvante di Freund incompleto (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Il topo B (0% “hits” nel processo di
20 ibridoma) era un topo transgenico HCo12 (Medarex) immunizzato con 20 µg della proteina AXLECDHis usando un protocollo di immunizzazione simile a quello del topo A. Il topo C (38% “hints” nel processo di ibridoma) era un topo HCo12-BALB/c immunizzato, in modo alternato, per via intraperitoneale (IP) con cellule EL4 trasfettate
25 con AXL umano a lunghezza intera in PBS e per via sottocutanea (SC;



alla base della coda) con la proteina AXLECDHis in IFA, con un intervallo di 14 giorni. Il topo D (0% “hints” nel processo di ibridoma) era un topo transgenico HCo12 (Medarex) immunizzato con 20 µg della proteina AXL-Ig12ECDHis usando un protocollo di immunizzazione
5 simile a quello del topo A.

I topi con almeno due titoli sequenziali di anticorpi specifici per AXL di 200 (diluizioni sieriche di 1/200) o superiori, erano potenziati 3-4 giorni prima della fusione (10 µg di proteina derivata da AXL in PBS iniettata per via endovenosa).

10 Isolamento di RNA dalle cellule della milza

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule della milza utilizzando il “Mini RNA easy kit” (Qiagen). Il primo filamento di cDNA per 5'-RACE è stato sintetizzato utilizzando 150 ng di RNA utilizzando lo “SMART RACE cDNA Amplification kit” (Clontech, Mountain View, CA, USA),
15 “PrimeScript Reverse Transcriptase” (Clontech) e gli oligo e oligodT “SMART IIA” come primer. Le regioni codificanti VL sono state amplificate mediante PCR utilizzando la polimerasi “Advantage 2” (Clontech), i primer RACEkLIC4shortFW2 (320 nM), RACEkLIC4LongFW2 (80 nM) e RACEkLICRV_PmIA3 (400 nM),
20 eseguendo 35 cicli di 30 secondi a 95°C, e 1 minuto a 68°C. Le regioni codificanti VH sono state amplificate mediante PCR usando la DNA polimerasi “Pfu Ultra II Fusion HS” (Stratagene), i primer RACEG1LIC3shortFW (320 nM), RACEG1LIC3longFW (80 nM) e RACEG1LIC3RV2 (400 nM), eseguendo 40 cicli di 20 secondi a 95°C e
25 al., 20 secondi a 66°C e 30 secondi a 72°C, terminando con una fase di



GEN014ESM

estensione finale di 3 minuti a 72°C. I prodotti di PCR codificanti VH o VL sono stati separati usando elettroforesi su gel di agarosio e i prodotti di DNA delle dimensioni previste sono stati tagliati dal gel e purificati usando il kit “Qiagen MiniElute”. Le regioni codificanti VH e VL amplificate mediante PCR sono state clonate, in frame, nei vettori pGlf di espressione di mammiferi (contenente la sequenza di DNA codificante la regione costante di IgG1 umana) per la regione VH e pKappa (contenente la sequenza di DNA codificante la regione costante della catena leggera kappa) per la regione VL, mediante clonaggio indipendente dalla ligazione (Aslanidis, C. e P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74) nel ceppo DH5αT1R di E.coli (Life Technologies), producendo singole colonie batteriche ognuna contenente un singolo vettore di espressione HC o LC.

Sequenze dei primer

Nome del primer	Sequenza del primer
SMARTIIA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG (SEQ ID NO:154)
RACEkLIC4shortFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACT (SEQ ID NO:155)
RACEkLIC4LongFW2	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGA (SEQ ID NO:156)
RACEkLICRV_PmlA3	5'-CAGCAGGCACACCACTGAGGCAGTTCCAGATTTC (SEQ ID NO:157)
RACEG1LIC3shortFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACT (SEQ ID NO:158)
RACEG1LIC3longFW	5'-ACGGACGGCAGGACCACTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG T (SEQ ID NO:159)
RACEG1LIC3RV2	5'-GGAGGAGGGCGCCAGTGGGAAGACCGA (SEQ ID NO:160)
CMV P f (RRA2)	5'-GCCAGATATACGCGTTGACA (SEQ ID NO:161)



PCR di LEE

Gli elementi di espressione lineare (LEE) sono stati prodotti amplificando il frammento contenente il promotore di CMV, le regioni
5 codificanti HC o LC e gli elementi contenenti il segnale poli-A dai plasmidi di espressione. Per questo, le regioni sono state amplificate utilizzando la DNA polimerasi Taq "Accuprime" (Life Technologies) e i primer CMVPf (Bsal) 2 e TkpA (Bsal)r, eseguendo 35 cicli di 45 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 2 (LC) o 3 (HC) minuti a 68°C, usando
10 materiale delle colonie di E.coli (ceppo DH5α), contenente i plasmidi, come templatato di DNA.

Espressione transiente in cellule HEK-293

Gli anticorpi sono stati espressi come IgG1,κ. Le miscele di DNA plasmidico codificanti sia le catene pesanti sia leggere degli
15 anticorpi sono state transientemente trasfettate in cellule Freestyle 293-F (HEK293F) (Life Technologies, USA) usando 293fectina (Life Technologies) essenzialmente come descritto da Vink, T., et al. (2014) ("A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies ", Methods, 65 (1), 5-10).

20 Per l'espressione di LEE di Abs, 1 µl della miscela di reazione PCR di LEE di HC, 1 µl della miscela di reazione PCR di LC e 1 µl di una miscela di potenziamento 30 ng/µl contenente una miscela di 3 plasmidi di potenziamento dell'espressione come descritti in Vink, T., et al.(2014), sono stati miscelati e trasfettati in cellule HEK293F in un

volume totale di 100 µl usando 293 fectina come reagente di trasfezione, secondo le istruzioni del produttore (Life Technologies), usando piastre da 96 pozzetti come recipiente, essenzialmente come descritto sopra.

ELISA con AXLECDHis

5 Piastre ELISA (Greiner, Paesi Bassi) sono state rivestite con 100 µl/pozzetto di 0,5 µg/ml di AXLECDHis in tampone fosfato salino (PBS) e incubate per 16 ore a temperatura ambiente (RT). La soluzione di rivestimento è stata rimossa e i pozzetti sono stati bloccati aggiungendo 150 µl di PBSTC (PBS contenente 0,1% tween-20 e siero di
10 pollo 2%) per pozzetto e incubando per 1 ora a RT. Le piastre sono state lavate tre volte con 300 µl di PBST (PBS contenente 0,1% tween-20)/pozzetto e sono stati aggiunti 100 µl di soluzione di test, seguito da un'incubazione di 1 ora a RT. Dopo aver lavato tre volte con 300 µl di
15 PBST/pozzetto, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo IgG di capra anti-umano accoppiato con perossidasi di rafano (diluito 1/3000) e incubati per 1 ora a RT. Dopo aver lavato tre volte con 300 µl di PBST/pozzetto, 100 µl di soluzione ABTS (1mg/ml) sono stati aggiunti e incubati a RT fino a quando è stato osservato un segnale sufficiente e la reazione è stata fermata aggiungendo 100 µl di una soluzione di acido ossalico al
20 2%. Le piastre a 96 pozzetti sono state misurate su un lettore ELISA a 405 nm.

Screen di diversità

I campioni sono stati analizzati per il legame degli anticorpi a cellule TH1021-hAXL (cellule HEK293F che esprimono transientemente
25 l'AXL umano), cellule TH1021-cAXL (cellule HEK293F che esprimono



GEN014ESM

transientemente chimere di AXL umano-cynomolgus in cui l'ECD umano era stato sostituito con l'ECD di AXL di scimmia cinomolgus), cellule TH1021-mAXL (cellule HEK293F che esprimono transientemente esprimere chimere di AXL umano-murino in cui l'ECD umano era stato
5 sostituito con l'ECD di AXL murino), cellule TH1021-mlg1 (cellule HEK293F che esprimono transientemente l'AXL umano con il dominio I simile a Ig che è stato sostituito dal dominio I di AXL murino), cellule TH1021-mlg2 (cellule HEK293F che esprimono transientemente AXL umano con il dominio II simile a Ig che è stato sostituito dal dominio II
10 simile a Ig di AXL murino), cellule TH1021-mFN1 (cellule HEK293F che esprimono transientemente AXL umano con dominio I simile a FNIII che è stato sostituito dal dominio I simile a FNIII di AXL murino), cellule TH1021-mFN2 (cellule HEK293F che esprimono transientemente AXL umano con il dominio II simile a FNIII che è stato sostituito dal dominio
15 II simile a FNIII di AXL murino) e cellule HEK293F (controllo negativo che non esprime AXL), rispettivamente.

I campioni dell'espressione di LEE sono stati aggiunti alle cellule per consentire il legame ai vari costrutti di AXL. Successivamente, il legame degli anticorpi è stato rilevato utilizzando un
20 coniugato fluorescente (Fc gamma di IgG di capra anti-umano-DyLight649; Jackson ImmunoResearch). I campioni sono stati analizzati utilizzando "Applied Biosystem 8200 Cellular Detection System" (8200 CDS) e la fluorescenza media è stata usata come lettura. I campioni sono stati dichiarati positivi quando i conteggi erano
25 superiori a 50 e conteggi x fluorescenza era almeno tre volte superiore



al controllo negativo.

Fornitura di pool HC e LC:

Per ogni topo, 352 colonie batteriche contenenti il vettore di espressione HC e 384 colonie batteriche contenenti il vettore di espressione LC sono state raccolte e amplificate mediante PCR di LEE. Parte della reazione di LEE è stata sequenziata (AGOWA). La percentuale di costrutti contenenti l'inserto VH adeguato differiva ampiamente tra i 4 topi, topo A (50%), topo B (23%), topo C (90%) e topo D (14%) e assomigliava alla variazione di "hits" ottenuti nel processo di ibridoma, si veda sopra. La diversità di HC nei topi con solo una quantità limitata di inserti adeguati era dominata da un grande gruppo di HC identici, 65/83 nel topo B e 46/49 nel topo D. Per il topo B e il topo D, sono stati selezionati gli HC unici (9 per topo B, 4 per topo D). Per il topo A e il topo C non è stata effettuata alcuna selezione.

15 Co-trasfezione dei HC con un pool di LC

I singoli LEE codificanti HC sono stati co-trasfettati con un pool di 96 LEE codificanti LC utilizzando il protocollo trasfezione per LEE.

Selezione di HC di anticorpi che legano AXL

20 Per il topo B e D, i surnatanti delle co-trasfezioni LEE del singolo HC con gli LC in pool sono stati analizzati per il legame a AXL delle miscele di anticorpi prodotte mediante ELISA di AXL. 7 dei 9 HC del topo B hanno prodotto un legame a AXL, e 4 su 4 HC del topo D hanno prodotto un legame a AXL.

25 Per i topi A e C, i surnatanti delle co-trasfezioni LEE del



singolo HC con gli LC in pool sono stati analizzati per il legame a AXL delle miscele di anticorpi prodotte mediante screen di diversità. Questo screen ha permesso sia l'identificazione di HC che legano AXL sia una mappatura epitopica approssimativa, mediante identificazione della perdita di legame degli anticorpi alle varianti di AXL. Dal topo A, circa il 40% degli HC si legava a AXL umano, la maggior parte dei quali perdeva il legame o con il dominio Ig1 o con il dominio FNIII-2, quando questi domini erano stati sostituiti dall'equivalente murino. Dal topo C, circa 70% degli HC si legava a AXL umano, la maggior parte dei quali perdeva il legame o con il dominio Ig1 o con il dominio Ig2, quando questi domini erano stati sostituiti dall'equivalente murino. In base al legame come determinato mediante ELISA di AXL o screen di diversità, l'informazione sulla sequenza HC e la perdita di legame a specifici domini di AXL nello screen di diversità, è stato selezionato un totale di 12 HC unici per la determinazione del miglior LC.

Co-trasfezione di HC con singoli LC

Ogni singolo LEE di HC dei 12 unici HC selezionati è stato co-trasfettato con 96 singoli LEE di LC dal pool di LC dei topi corrispondenti.

Selezione di LC di anticorpi che legano AXL

I surnatanti dell'espressione di LEE delle singole combinazioni di HC/LC sono stati analizzati per il legame a AXL dell'anticorpo prodotto mediante ELISA di AXL. Per ogni HC sono stati trovati almeno 6 LC ed è stato selezionato un singolo LC come migliore, in base sia ai risultati di ELISA sia all'informazione sulla sequenza di LC. Gli anticorpi



che legano AXL sono stati identificati da tutti e 4 i topi, anche dai topi che non hanno avuto successo nel processo di ibridoma.

Affinità di legame dell'anticorpo 511

È stata determinata l'affinità di un anticorpo anti-AXL (clone
5 511).

L'affinità è stata determinata utilizzando l'interferometria a
“Bio-Layer” su un ForteBio OctetRED384. I biosensori “Anti-human Fc
Capture” (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Regno Unito; n. Cat. 18-5064)
sono stati caricati per 150 s con hlgG (1 µg/mL) mirando ad una
10 risposta di caricamento di 1 nm. Dopo una baseline (150 s), è stata
determinata l'associazione (1000 s) e la dissociazione (2000 s) di
AXLECDHis (come descritto nell'esempio 1), utilizzando un intervallo di
concentrazione di 10 µg/mL - 0,16 µg/mL (218 nM - 3 nM) con due
passaggi di diluizione. Per i calcoli, è stata utilizzata la massa
15 molecolare teorica di AXLECDHis basata sulla sequenza
amminoacidica, ovvero 46 kDa. Gli esperimenti sono stati condotti su
OctetRED384, durante un'agitazione a 1000 rpm e a 30°C. Ogni
anticorpo è stato testato in tre esperimenti indipendenti.

I dati sono stati analizzati con “ForteBio Data Analysis
20 Software” v7.0.3.1, utilizzando il modello 1: 1 e un “full fit” globale con
tempo di associazione di 1000 secondi e tempo di dissociazione di 1000
s se non diversamente indicato. È stato utilizzato un tempo di
dissociazione di 1000 s (anziché del tempo di dissociazione di 2000 s
che è stato acquisito) poiché ciò ha comportato migliori “fit”. Le tracce
25 dei dati sono state corrette per sottrazione di una curva di riferimento

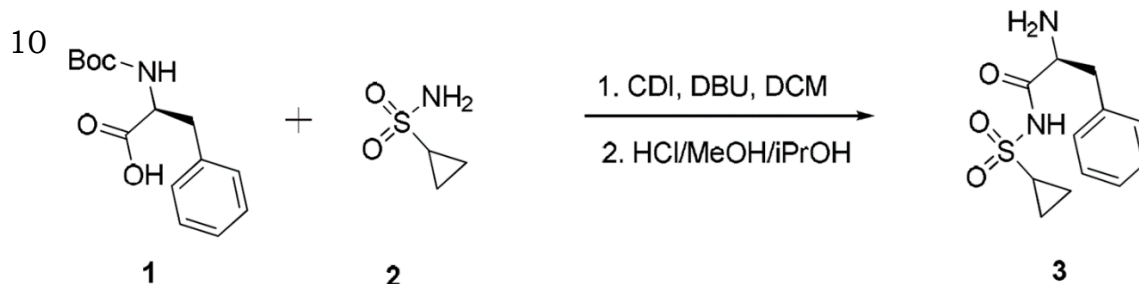


(anticorpo senza AXLECDHis), l'asse Y è stato allineato agli ultimi 5 s della baseline, e sono state applicate la correzione inter-step e il filtro "Savitzky-Golay".

L'affinità (K_D) del clone 511 per AXL era $23 \cdot 10^{-9} M$ (k_{on} $1,7 \cdot 10^5$ 1/Ms e un k_{dis} di $3,9 \cdot 10^{-3}$ 1/s).

Sintesi di duostatina-3

Preparazione del composto 3:



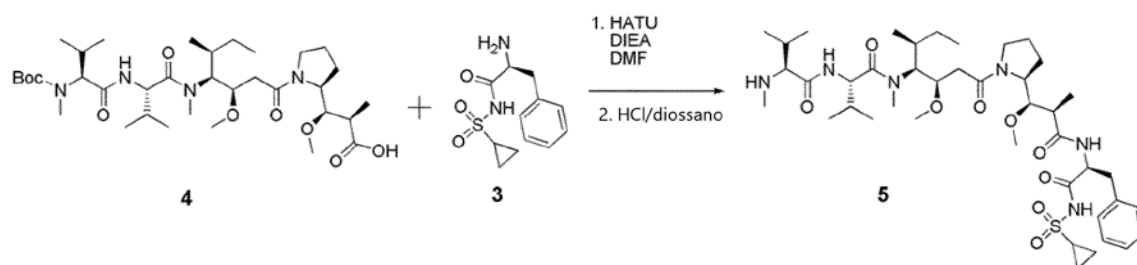
15

A una soluzione di Boc-L-fenilalanina 1 (5,36 g et al., 20,2 mmol) in 30 mL di cloruro di metilene (DCM), è stato aggiunto carbonildiimidazolo (CDI, 4,26 g, 26,3 mmol) e agitato per 1 ora. Poi è stata aggiunta una soluzione di 2 (3,67 g, 30,3 mmol) e acido 2,4-diamminobutirrico (DBU, 4,5 mL, 30 mmol) in 15 mL di DCM. La miscela è stata riscaldata a 40°C per 16 ore. La miscela è stata diluita con 60 mL di DCM e 40 mL di acqua, poi neutralizzata a pH 7 con HCl conc.

L'estratto di DCM è stato raccolto, lavato con HCl 0,2 M (60 mL), poi con acqua salina ("brine") (60 mL), essiccato su Na_2SO_4 , e

soggetto a evaporazione per dare 7,47 g di solfonammide protetta da Boc. Questo materiale è stato poi sospeso in 40 ml di metanolo, poi sono stati aggiunti 200 mL di HCl / isopropanolo 6N e la miscela è stata agitata per 2 ore. Il solvente è stato evaporato sottovuoto, sono stati poi
 5 aggiunti 100 ml di etere. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione ed è stato essiccato per dare il composto 3 come sale HCl (5,93 g, 96%); MS m/z 269,1 (M + H).

Preparazione del composto 5

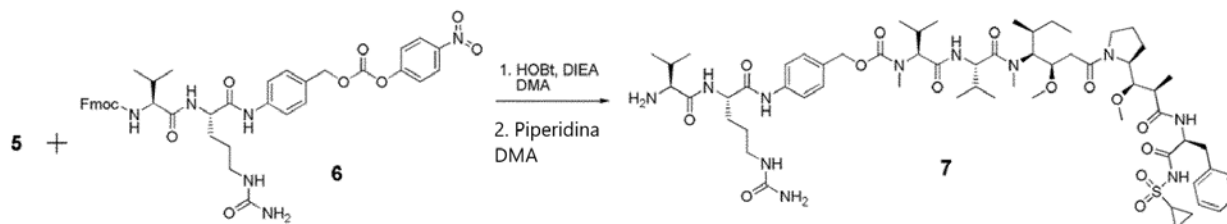


10 A una soluzione del composto 4 (1,09 g, 1,6 mmol) in 10 mL di N,N-Dimetilformammide (DMF), è stata aggiunta 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurano esafluorofosfato (HATU, 0,61 g, 1,6 mmol), diisopropililammina (DIEA, 0,56 mL) e composto 3
 15 (0,49 g, 1,6 mmol) in questo ordine. La miscela è stata agitata per 1 ora e diluita con 100 ml di acqua e 4 ml di acido acetico. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, essiccato sottovuoto e aggiunto a 10 ml di HCl/diossano 4M. Dopo 30 minuti *et al.*, sono stati aggiunti 200 mL di etere e il precipitato insolubile è stato raccolto e purificato mediante HPLC per dare il composto 5 come sale di tetraidrofurano

GEN014ESM

(TFA, 1,3 g, 88%); MS m/z 835,5 (M + H). Il composto 5 è indicato come duostatina-3 in tutto il manoscritto.

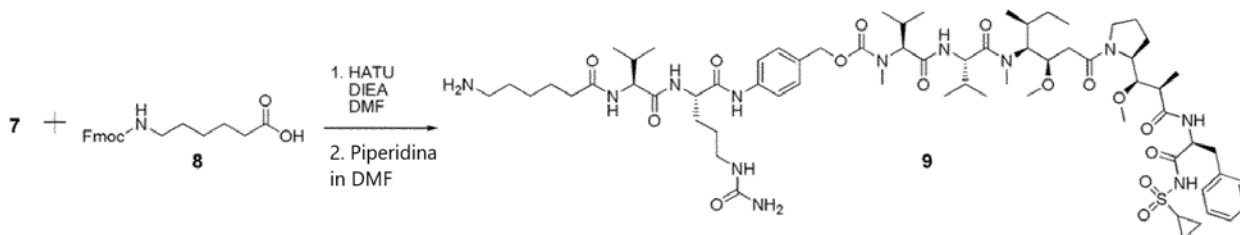
Preparazione del composto 7



5

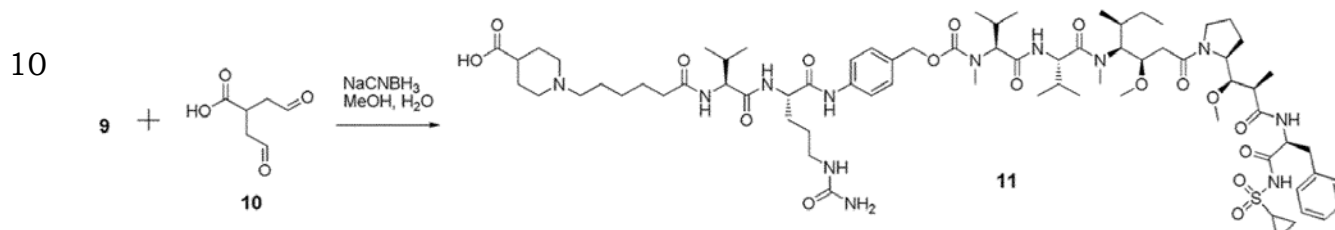
Ad una soluzione del composto 5 (500 mg, 0,527 mmol) in 5 ml di DMF è stato aggiunto il composto 6 (483 mg, 0,631 mmol), N-idrossibenzotriazolo (HOBt, 40 mg, 0,296 mmol) e DIEA (0,27 mL). La miscela è stata agitata per 16 ore dopo di che sono stati aggiunti 0,4 mL di piperidina. Dopo 1 ora, la miscela è stata diluita con 100 mL di etere e il precipitato è stato raccolto ed essiccato per dare il composto 7 come sale HCl (640 mg, 95%); MS m/z 1240,7 (M + H).

Preparazione del composto 9



Ad una soluzione del composto 8 (219 mg, 0,62 mmoli) in 5 ml di DMF è stato aggiunto HATU (236 mg, 0,62 mmol), DIEA (0,15 mL) e composto 7 (316 mg, 1,6 mmol), rispettivamente. Dopo 1 ora, sono stati aggiunti 0,2 mL di piperidina e la miscela è stata agitata per 30 minuti, poi purificata mediante HPLC per dare il composto 9 come sale TFA (235 mg, 64%); MS m/z 1353,8 (M + H).

Preparazione del composto 11



Ad una soluzione del composto 9 (235 mg, 0,16 mmol) in 2 mL di metanolo e 1 mL di acqua è stata aggiunta una soluzione di dialdeide 10 (1,6 mL di 0,3 M in iPrOH) e NaCNBH₃ (180 mg, 2,85 mmol). La miscela è stata agitata per 2 ore a RT, e poi purificata mediante HPLC dando origine al composto 11 come sale TFA (126 mg, 50%); MS m/z

1465,8 (M + H).

Generazione di coniugati anticorpo-farmaco specifici per AXL (ADC)

5 Gli anticorpi purificati contro AXL, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726 nonché l'anticorpo di controllo negativo IgG1-b12 sono stati coniugati con duostatina-3 mediante "Concortis Biosystems, Inc." (San Diego, CA) attraverso coniugazione covalente usando il linker K-lock AV1-valina-citrullina (vc) (WO 2013/173391, WO 2013/173392 e WO 2013/173393 di Concortis Biosystems).

10 I coniugati di anticorpo anti-AXL farmaco sono stati successivamente analizzati per la concentrazione (mediante assorbanza a 280 nm), il rapporto farmaco-anticorpo (il "DAR") mediante cromatografia in fase inversa (RP-HPLC) e cromatografia per interazione idrofobica (HIC), la quantità di farmaco non coniugato (mediante
15 cromatografia in fase inversa), l'aggregazione percentuale (mediante cromatografia per esclusione dimensionale, SEC-HPLC) e livelli di endotossina (mediante LAL). I risultati sono stati i seguenti (Tabella 5):

Tabella 5

	IgG1-AXL-148-vc Duostatina-3	IgG1-AXL-183-vc Duostatina-3	IgG1-AXL-726-vc Duostatina-3	IgG1-b12-vc Duostatina-3
Concentrazione (mg/mL)	6,57	3,40	5,93	3,36
DAR mediante HIC-HPLC	1,71	1,79	1,77	2,05
% farmaco non coniugato	6,67	4,16	5,38	4,19
% aggregato mediante SEC-HPLC	3,71%	3,35	3,42	1,75

20

Esempio 2- Caratteristiche di legame degli anticorpi contro AXL



Affinità di legame degli anticorpi contro AXL

Sono state determinate le affinità del pannello di 9 anticorpi anti-AXL nonché di 3 varianti di questi anticorpi con singole mutazioni amminoacidiche nei domini variabili (IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q, IgG1-AXL-726-M101L).

Le affinità sono state determinate usando l'interferometria di tipo "Bio-Layer" su ForteBio OctetRED384. Biosensori "Anti-human Fc Capture" (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Regno Unito; n. Cat. 18-5064) sono stati caricati per 150 s con hlgG (1 µg/mL) mirando ad una risposta di caricamento di 1 nm. Dopo una baseline (150 s) è stata determinata l'associazione (1000 s) e la dissociazione (2000 s) di AXLECDHis (come descritto nell'esempio 1), usando un intervallo di concentrazione di 10 µg/mL - 0,16 µg/mL (218 nM - 3 nM) con due passaggi di diluizione. Per i calcoli, è stata utilizzata la massa molecolare teorica di AXLECD basata sulla sequenza amminoacidica, ovvero 46 kDa. Gli esperimenti sono stati condotti su un OctetRED384, durante un'agitazione a 1000 rpm e a 30°C. Ogni anticorpo è stato testato in tre esperimenti indipendenti.

I dati sono stati analizzati con "ForteBio Data Analysis Software v7.0.3.1", utilizzando il modello 1:1 e un "full fit" globale con tempo di associazione di 1000 s e tempo di dissociazione di 1000 s se non diversamente indicato. È stato utilizzato un tempo di dissociazione di 1000 s (anziché del tempo di dissociazione di 2000 s che è stato acquisito) poiché ciò ha comportato migliori "fit". Per l'anticorpo IgG1-AXL-154 e IgG1-AXL-154-M103L è stato usato un tempo di



dissociazione di 500 s. Per IgG1-AXL-012 e IgG1-AXL-094 sono stati usati tempi di dissociazione di 200 s. Le tracce dei dati sono state corrette per sottrazione di una curva di riferimento (anticorpo senza AXLECDHis), l'asse Y è stato allineato agli ultimi 5 s della baseline, e sono state applicate la correzione inter-step e il filtro "Savitzky-Golay".

Le affinità (K_D) degli anticorpi anti-AXL variavano da $0,3 \cdot 10^{-9}$ M a $63 \cdot 10^{-9}$ M (Tabella 6). Per il mutante IgG1-AXL-183-N52Q, la K_D era inferiore rispetto a IgG1-AXL-183 di tipo selvatico, a causa di una velocità di dissociazione circa 2,5 volte superiore. Le cinetiche osservate degli altri due mutanti erano simili alle cinetiche delle IgG di tipo selvatico.

Tabella 6

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

Legame di anticorpi contro AXL a AXL umano, murino e di cinomolgus

Le cellule HEK293T sono state transfettate transientemente con costrutti di espressione per AXL umano a lunghezza intera, AXL

umano con un dominio extracellulare (ECD) di scimmia cynomolgus o AXL umano con un ECD murino (vedi Esempio 1). Il legame degli anticorpi HuMab-AXL a queste cellule è stato valutato mediante citometria a flusso. Le cellule HEK293 trasfettate sono state incubate
5 con diluizioni seriali di anticorpi contro AXL (intervallo di concentrazione finale 0,0024-10 µg/mL) per 30 minuti a 4°C. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule sono state incubate con F(ab')₂ di IgG di capra anti-umano coniugato a R-ficoeritrina(PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West
10 Grove, PA; cat. N. 109-116-098) diluito 1/100 in PBS/0,1% BSA/0,02% azide (volume finale 100 µL). Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 µl di PBS/0,1% BSA/0,02% di azide e analizzate su un "Cantoll" FACS (BD Biosciences).

15 Le curve di legame sono state analizzate usando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile) utilizzando il software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La **Figura 1A** mostra che gli anticorpi HuMab-AXL hanno
20 mostrato un legame dose-dipendente alle cellule HEK293 che esprimevano ECD di AXL umano. Inoltre, gli anticorpi HuMab-AXL hanno riconosciuto AXL con un ECD di scimmia cynomolgus, con valori di EC₅₀ nello stesso intervallo di AXL completamente umano (**Figura 1B**). Al contrario, il legame dei HuMab ad AXL con un ECD murino era
25 basso (IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-



733, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-183-N52Q) o non rilevabile (IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-726, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-148; **Figura 1C**). Come previsto, l'anticorpo di controllo negativo IgG1-b12 non ha mostrato (**Figura 1**) alcun legame con le cellule che esprimono qualsiasi delle varianti di AXL. La Tabella 7 mostra i valori di EC₅₀ e le deviazioni standard per il legame degli anticorpi anti-AXL a AXL umano o a AXL umano con un ECD di AXL di cynomolgus (determinato in almeno 3 esperimenti). I valori di EC₅₀ per il legame a AXL umano con un ECD di AXL murino non potevano essere determinati a un legame molto basso o assente.

Tabella 7

Anticorpo	Legame EC50 (µg/mL)	
	AXL umano Media (s.d.)	AXL di cynomolgus Media (s.d.)
IgG1-AXL-107	0,050 (0,004)	0,149 (0,021)
IgG1-AXL-154	0,105 (0,003)	0,160 (0,027)
IgG1-AXL-154-M103L	0,110 (0,038)	0,161 (0,042)
IgG1-AXL-171	0,073 (0,023)	0,157 (0,057)
IgG1-AXL-613	0,040 (0,023)	0,146 (0,023)
IgG1-AXL-726	0,288 (0,206)	0,349 (0,160)
IgG1-AXL-726-M101L	0,184 (0,117)	0,250 (0,066)
IgG1-AXL-733	0,176 (0,094)	0,254 (0,114)
IgG1-AXL-148	0,094 (0,059)	0,152 (0,080)
IgG1-AXL-183	0,526 (0,177)	0,309 (0,086)
IgG1-AXL-183-N52Q	0,350 (0,206)	0,324 (0,121)

Competizione tra gli anticorpi contro AXL e Gas6 per il legame a AXL

È stato testato se il ligando Gas6 di AXL interferiva con il legame a AXL degli anticorpi contro AXL. Perciò, le cellule A431 positive

GEN014ESM

per AXL sono state incubate per 15 minuti a 4°C con Gas6 umano ricombinante 10 µg/mL (R&D Systems, Abingdon, UK; cat. No. 885-GS). Successivamente, sono state preparate diluizioni seriali di anticorpi contro AXL (intervallo di concentrazione finale 0,014-10 µg/mL),
5 aggiunte alle cellule e incubate per 30 minuti a 4°C. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule sono state incubate in 100 µl con l'anticorpo secondario a 4°C per 30 minuti al buio. Come anticorpo secondario che legava la regione Fc, è stato utilizzato F(ab')₂ di IgG di capra anti-umano coniugato a R-ficoeritrina(PE) (Jackson
10 ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania; cat. no. 109-116-098) diluito 1/100 in PBS/0,1% BSA/0,02% azide. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 µl di PBS/0,1% BSA/0,02% azide e analizzate su un Cantoll FACS (BD Biosciences).

15 In alternativa, le cellule A431 sono state preincubate con anticorpi contro AXL 10 µg/mL (15 minuti, 4°C) per valutare se il ligando Gs6 di AXL potesse ancora legarsi in presenza di anticorpi contro AXL. Dopo la preincubazione degli anticorpi, diluizioni seriali di Gas6 umano ricombinante (R&D Systems, Abingdon, UK; cat. No. 885-
20 GS) sono state aggiunte alle cellule alle concentrazioni finali di 0,001-20 µg/mL e incubate per 30 minuti a 4°C. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule sono state incubate con IgG2a anti-Gas6 murino (R&D Systems; cat no. MAB885) a 4°C per 30 minuti. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule
25 sono state incubate con IgG di capra anti-murino marcato con FITC



(Dako, Heverlee, Belgio; cat n. F049702) a 4°C per 30 minuti al buio. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 µl di PBS/0,1% di BSA/0,02% azide e analizzate su un Cantoll FACS (BD Biosciences).

5 Le curve di legame sono state analizzate utilizzando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile) utilizzando il Software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

10 Negli esperimenti (n = 3) in cui le cellule A431 sono state preincubate con Gas6, i valori di legame massimo degli anticorpi anti-AXL erano comparabili al legame anticorpale in assenza di Gas6 (il legame massimo dopo la pre-incubazione di Gas6 era 90-108% di legame senza la pre-incubazione di Gas6) (Tabella 7). I valori EC₅₀ per il
15 legame degli anticorpi contro AXL con o senza la pre-incubazione di Gas6 erano nello stesso intervallo, o leggermente aumentati dopo la pre-incubazione di Gas6 (Tabella 8).

Il legame dell'anticorpo AXL di controllo YW327.6S2 alle cellule A431 è stato notevolmente ridotto in presenza di Gas6 rispetto al legame senza Gas. Il legame massimo di YW327.6S2 in presenza di
20 Gas6 era 19% di legame senza Gas6 e il valore di EC₅₀ per il legame alle cellule A431 era 21 volte superiore quando le cellule erano state preincubate con Gas6.

Negli esperimenti in cui le cellule A431 sono state preincubate con anticorpi anti-AXL, è stato valutato il legame di Gas6 (n = 3). Il
25 legame di Gas6 alle cellule A431 era simile con o senza pre-incubazione



GEN014ESM

con gli anticorpi HuMab-AXL. Le concentrazioni medie di EC50 del legame di Gas6 quando le cellule erano preincubate con gli HuMab (0,34-0,83 µg/mL) e il legame massimo di Gas6 erano simili al legame di Gas6 in presenza dell'anticorpo di controllo negativo b12 (concentrazione di EC50: 0,40 µg/mL; 95-115% di legame di Gas6 in presenza dell'anticorpo di controllo b12). Il legame di Gas6 alle cellule A431 è stato notevolmente ridotto in presenza dell'anticorpo di controllo YW327.6S2 contro AXL rispetto alla pre-incubazione con b12 (concentrazione di EC50 era 14 volte superiore). Il legame massimo di Gas6 in presenza dell'anticorpo di controllo YW327.6S2 era 17% di legame in presenza dell'anticorpo di controllo negativo b12.

Tabella 8

Anticorpo	Legame dell'anticorpo a cellule A431			Legame di Gas6 a cellule A431	
	EC50 senza Gas6 EC50 (µg/mL) media (s.d.)	EC50 in presenza di Gas6(µg/mL) media (s.d.)	Legame massimo in presenza di Gas6 (% di legame in assenza di Gas6) media (s.d.)	EC50 in presenza di anticorpi contro AXL (µg/mL) media (s.d.)	Legame massimo in presenza di anticorpi contro AXL (% di legame in presenza di anticorpo di controllo) media (s.d.)
IgG1-AXL-107	0,16 (0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-148	0,11 (0,13)	0,20 (0,30)	93 (5)	0,73 (0,52)	106 (7)
IgG1-AXL-154	0,42 (0,55)	0,76 (0,78)	99 (13)	0,44 (0,28)	95 (10)
IgG1-AXL-171	0,18 (0,21)	0,32 (0,40)	95 (5)	0,69 (0,42)	108 (5)
IgG1-AXL-183	0,69 (0,72)	1,19 (1,11)	90 (19)	0,34 (0,13)	115 (8)
IgG1-AXL-511	0,12 (0,11)	0,30 (0,31)	93 (15)	0,74 (0,44)	113 (6)
IgG1-AXL-613	0,09 (0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)
IgG1-AXL-726	0,32 (0,35)	0,55 (0,69)	97 (10)	0,77 (0,58)	98 (10)
IgG1-AXL-733	0,49 (0,51)	0,62 (0,23)	93 (5)	0,83 (0,54)	96 (5)
YW327.6S2	0,09 (0,09)	1,90 (1,04)*	41 (24)	5,53 (7,09)*	17 (10)
b12	n.a. ^a	n.a.	n.a.	0,40 (0,11)	100

n.a., non applicabile

*valori di EC50 meno accurati a causa di un legame ridotto.

Esempio 3 - La mappatura epitopica studia il pannello degli anticorpi anti-AXL

5 Determinazione della specificità per dominio di AXL utilizzando molecole chimeriche di AXL umano-murino

La specificità per dominio di AXL degli anticorpi contro AXL è stata determinata usando un pannello di mutanti di AXL chimerico umano-murino. Sono state generate cinque diverse molecole di AXL
10 chimerico, in cui il dominio I simile a Ig umano (Ig1), il dominio II simile a Ig (Ig2), il dominio I simile a FNIII umano (FN1) o il dominio II simile a FNIII umano (FN2) sono stati sostituiti con i loro omologhi murini.

Sono stati generati i seguenti costrutti ottimizzati per codone per l'espressione delle chimere di AXL umano -murino e sono stati
15 espressi in cellule HEK293F come descritto nell'Esempio 1:

AXL di *Homo sapiens* (p33-HAHs-AXL): (SEQ ID NO:148)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAPRGTTQAE
ESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQILELADSTQ
TQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYV
20 GLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAP
GHGPQRSLSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVS
RQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSNDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQ
ASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPP
ENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQ
25 EVTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLVPLEAWRPGQAQPVHQL



GEN014ESM

VKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPT
VERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALG
KTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCM
KEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQ
5 PVYLP TQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV CVAD
FGLSKKIYNGDYRQGR IAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMW
EIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNP
QDRPSFTELREDLENTL KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGA
DPPTQDPK DSCSCLTAAEVHPAGRYVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQE
10 DGA

AXL di *Mus musculus* (p33-HAMm-AXL): (SEQ ID NO:149)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQT
EAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGEPPPEVVWLRDGQILELADN
15 TQTQVPLGEDWQDEWKVVSQ L R I S A L Q L S D A G E Y Q C M V H L E G R T F V S Q P
GFVGLGLELPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQDAVPLA
PVTGHSSQHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQRPHHLH
VVS R Q P T E L E V A W T P G L S G I Y P L T H C N L Q A V L S D D G V G I W L G K S D P P E D P L
TLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRISCSSSQG P S P W T H W L P V E T T E G V P L G
20 P P E N V S A M R N G S Q V L V R W Q E P R V P L Q G T L L G Y R L A Y R G Q D T P E V L M D I G L
TREVTLLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGQPLH
HLVSEPPPRAFS WPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFE
PTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVA
LGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC
25 MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLG



DQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCV
ADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTM
WEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELN
PQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGA
5 DPPTQDPKDESCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQE
DGA

AXL di *Homo sapiens*– dominio Ig1 di *Mus musculus* (p33-

AXL-mIg1): (SEQ ID NO:150)

10 MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGAR
GLTGTLRCELQVQGEPEVVWLRDGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWK
VVSQLRISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVGLGLPYFLEEPED
RTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGL
NKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPG
15 LSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSL
HPHTPYHIRVACTSSQGPSSWITHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAF
VHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGSVS
NLTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPW
WYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVR
20 KSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVM
EGQLNQDDSDILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIG
VCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFM
ADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYR
QGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVEN
25 SEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLEN



TLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPDPKDSCLT
AAEVHPAGRYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL di *Homo sapiens* – dominio Ig2 di *Mus musculus* (p33-

5 **AXL-mIg2):** (SEQ ID NO:151)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNP
GNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDQILELADSTQTQVPLGED
EQDDWIVVSQLRITSLQSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVLEGLPYFL
EEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSL
10 QTPGLNKTSSFSCAEHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVA
WTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLR
LGSHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNG
SQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGD
GSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAF
15 SWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVR
YRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEF
GAVMEGQLNQDDS

ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF
QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADI
20 ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQG
RIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGTQPYPGVENSE
IYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNTL
KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPDPKDSCLTA
AEVHPAGRYVLCSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

25



AXL di *Homo sapiens* - dominio FN1 di *Mus musculus*

(p33-AXL-mFN1): (SEQ ID NO:152)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNP
GNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGED
5 EQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLEGLPYFL
EEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL
HVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQRPHHLHVVSQRQTELEV
AWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQL
RLEKLLPHTPYHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNG
10 SQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGD
GSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAF
SWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVR
YRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEF
GAVMEGQLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNV
15 MRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLYSRLGDQPVYLPTQM
LVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYN
GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRQTP
YPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTEL
REDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPDPK
20 DSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL di *Homo sapiens* - dominio FN2 di *Mus musculus*

(p33-AXL-mFN2): (SEQ ID NO:153)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNP
25 GNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGED



GEN014ESM

EQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLLEGLPYFL
EEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQPQRSL
HVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEV
AWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQL
5 RLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMR
NGSQVLVRWQEPRVPLQGTLGRLAYRGQDTPEVLMDIGLTREVTLELR
GDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGQPLHHLVSEPPPR
AFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELV
VRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGE
10 FGAVMEGQLNQDDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPN
VMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQ
MLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKI
YNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRQ
TPYPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFT
15 ELREDLENTLKAALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPD
PKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

Il legame dell'anticorpo anti-AXL 1 µg/mL alle chimere di AXL umano-murino è stato determinato mediante citometria a flusso, come descritto nell'Esempio 2. IgG1-b12 è stato incluso come IgG1 di controllo isotipico.

Tutti gli anticorpi anti-AXL hanno mostrato un legame a AXL umano (**Figura 2A**), mentre il legame è stato abrogato o fortemente ridotto quando l'ECD di AXL umano è stato sostituito con il suo omologo murino (**Figura 2B**). L'anticorpo YW327.6S2 contro AXL



monoclonale cross-reattivo umano-murino è stato incluso per confermare l'espressione di hsAXL-mmECD.

L'anticorpo anti-AXL 107 e 613 ha mostrato un legame fortemente ridotto a hsAXL-mmIg1 (**Figura 2C**), indicando il riconoscimento di un epitopo nel dominio Ig1 di AXL. IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-171 hanno mostrato un legame fortemente ridotto a hsAXL-mmIg2 (**Figura 2D**), indicando il riconoscimento di un epitopo nel dominio Ig2 di AXL. IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-733 hanno mostrato un legame ridotto a hsAXL-mmFN1 (**Figura 2E**), indicativo di un epitopo di legame nel dominio FN1 di AXL. Infine, il legame di IgG1-AXL-726 è stato perso in hsAXL-mmFN2 (**Figura 2F**), indicando il riconoscimento di un epitopo all'interno del dominio FN2.

La specificità dei domini di AXL per tutti gli anticorpi anti-AXL è riassunta nella Tabella 9.

15

Tabella 9

Anticorpo	Specificità dei domini di AXL	Amminoacidi di AXL coinvolti nel legame
IgG1-AXL-107	Ig1	L121-Q129
IgG1-AXL-148	Ig2	D170-R190
IgG1-AXL-154	Fn1	Q272-A287, G297-P301
IgG1-AXL-154-M103L	n.d. ^a	n.d.
IgG1-AXL-171	Ig2	P170, T182-R190
IgG1-AXL-183	Fn1	Non risolto
IgG1-AXL-183-N52Q	n.d.	n.d.
IgG1-AXL-613	Ig1	T112-Q124
IgG1-AXL-726	Fn2	A359, R386, Q436-K439
IgG1-AXL-726-M101L	n.d.	n.d.

IgG1-AXL-733	Fn1	Non risolto
IgG1-AXL-061	Ig1	I97-Q124
IgG1-AXL-137	Ig1	Q57, E92-T105
YW327.6S2	Ig1	G39-D59
^a n.d., non determinato		

Mappatura epitopica ad alta risoluzione per identificare gli amminoacidi nel dominio extracellulare di AXL coinvolti nel legame degli anticorpi contro AXL

Per identificare gli amminoacidi nel dominio extracellulare di AXL coinvolti nel legame degli anticorpi anti-AXL, una libreria di varianti di sequenza di AXL è stata generata mediante ricombinazione delle sequenze di AXL derivate da specie con livelli variabili di omologia con la sequenza di AXL umana nel dominio extracellulare. In breve, un plasmide di espressione codificante AXL umano (Hs) è stato miscelato con plasmidi di clonaggio codificanti omologhi di AXL di *Mus musculus* (Mm), *Monodelphis domestica* (Md; opossum) *Anolis carolinensis* (Ac; lucertola) e *Tetraodon nigroviridis* (Tn; pesce palla) o viceversa. Una combinazione di due primer specifici per il vettore di clonaggio o per il vettore di espressione sono stati usati per eseguire una PCR che amplificava il dominio extracellulare (ECD) di AXL con tempo di allungamento abbreviato, forzando la denaturazione (“melting”) e il riappaiamento (“reannealing”) dei filamenti nascenti di replicazione del DNA durante il ciclo di PCR. L’ECD di lunghezza intera è stato amplificato utilizzando una PCR “nested”, ancora specifica per i prodotti di ricombinazione contenenti i termini originati da entrambi i vettori.

I prodotti risultanti della PCR di ECD di AXL sono stati clonati in un vettore di espressione creando AXL a lunghezza intera, e i

risultanti plasmidi sono stati sequenziati, classificati in base alla differenza massima rispetto ai vettori del templatato e selezionati per creare un insieme minimo con il massimo potere di differenziazione. I plasmidi codificanti gli omologhi di AXL da Hs, Mm, Md, Ac e Tn, quattro plasmidi di chimere umane/murine codificanti AXL di Hs con domini Ig1, Ig2, Fn1 o Fn2 murini e i sedici plasmidi più differenziati dalla libreria di ricombinazione sono stati trasfettati in cellule HEK293-F secondo le specifiche fornite dal produttore (Life Technologies). I dati di legame di FACS usando anticorpi anti-AXL 1 µg/ml sono stati deconvoluti mediante punteggio per amminoacido se la mutazione era (+1) o non (-1) correlata alla perdita di legame, dopo di che è stata applicata una correzione e una normalizzazione della baseline su una scala da -5 a +5, ottenendo un punteggio di impatto per amminoacido sull'ECD completo.

I dati del legame deconvoluti sono riassunti nella Tabella 9 come amminoacidi coinvolti nel legame. Gli anticorpi i cui siti di legame non potevano essere mappati ad alta risoluzione, a causa della mancanza di eventi di ricombinazione in prossimità del sito di legame, sono indicati come non risolti.

Esempio 4 - Funzioni effettrici mediate da Fc
Citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi (ADCC)

La capacità degli anticorpi anti-AXL di indurre l'ADCC delle cellule di carcinoma epidermoide A431 è stata determinata come spiegato di seguito. Come cellule effettrici, sono state usate cellule



mononucleate del sangue periferico da volontari sani (UMC Utrecht, Paesi Bassi).

Marcatura delle cellule bersaglio

Sono state raccolte cellule A431 (5×10^6 cellule) in mezzo di
5 coltura (mezzo di coltura RPMI 1640 integrato con il 10% siero di vitello
fetale (FSC)), a cui sono stati aggiunti 100 μCi ^{51}Cr (Cromo-51;
Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Paesi Bassi) e la
miscela è stata incubata in un bagno d'acqua a 37°C per 1 ora (ora)
durante agitazione. Dopo lavaggio delle cellule (due volte in PBS, 1200
10 rpm, 5 min), le cellule sono state risospese in RPMI1640 / 10% FSC e
contate mediante esclusione con blu trypan. Le cellule sono state diluite
a una densità di 1×10^5 cellule/mL.

Preparazione delle cellule effettrici

Cellule mononucleate del sangue periferico (volontari sani,
15 UMC Utrecht, Utrecht, Paesi Bassi) sono state isolate da 45 ml di
sangue di eparina appena prelevato da Ficoll (Bio Whittaker; mezzo di
separazione dei linfociti, cat 17-829E) secondo le istruzioni del
produttore. Dopo la risospensione delle cellule in RPMI1640/10% FSC,
le cellule sono state contate mediante esclusione con blu trypan e
20 diluite a una densità di 1×10^7 cellule/mL.

Impostazione di ADCC

50 μl di cellule bersaglio marcate con ^{51}Cr sono state pipettate
in piastre da 96 pozzetti e sono stati aggiunti 50 μl di anticorpo, diluiti
in RPMI1640/10% FSC (diluizioni 3 volte a un intervallo di
25 concentrazioni finali compreso tra 0,01 e 10 $\mu\text{g/mL}$). Le cellule sono



state incubate (temperatura ambiente (RT), 15 min) e sono stati aggiunti 50 µl di cellule effettrici, producendo un rapporto effettrici-bersaglio di 100:1 (per la determinazione della lisi massima, sono stati aggiunti 100 µl di Triton-X100 5% invece delle cellule effettrici; per la determinazione della lisi spontanea, sono stati usati 50 µl di cellule target e 100 µl di RPMI1640/10% FCS). Le cellule sono state incubate durante la notte a 37°C e 5% CO₂. Dopo aver centrifugato le cellule (1200 rpm, 10 min), sono stati raccolti 70 µl di surnatante in provette microniche, e contate in un contatore gamma. La lisi specifica percentuale è stata calcolata come segue:

$$\% \text{ lisi specifica} = (\text{cpm del campione} - \text{cpm delle sole cellule target}) / (\text{cpm di massima lisi} - \text{cpm delle sole cellule target}), \text{ in cui cpm è conteggi al minuto.}$$

IgG1-AXL-183-N52Q e IgG1-AXL-733 hanno indotto ADCC dal 15 al 21% in cellule A431 ad una concentrazione di 10 µg/mL (**Figura 3**). IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-154-M103L non ha indotto un ADCC significativo nella cellula A431 a concentrazioni fino a 10 µg/mL (Figura 3).

Esempio 5 - Caratteristiche di legame dei coniugati anticorpo contro AXL-farmaco (AXL-ADCs)

Le cellule HEK293T sono state transfettate transientemente con costrutti di espressione per AXL umano a lunghezza intera (si veda Esempio 1). Il legame degli anticorpi anti-AXL e AXL-ADC a queste cellule è stato valutato mediante citometria a flusso. Le cellule HEK293



trasfettate transientemente sono state incubate con diluizioni seriali degli anticorpi anti-AXL o AXL-ADC (diluizioni 4 volte; intervallo di concentrazione finale 0,003-10 µg/mL) per 30 minuti a 4°C. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule sono state
5 incubate in 100 µl con anticorpo secondario a 4°C per 30 minuti al buio. Come anticorpo secondario, è stato utilizzato F(ab')₂ di IgG di capra anti-umano coniugato a R-ficoeritrina(PE)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat No. 109-116-098) diluito 1/100 in PBS/0,1% BSA/0,02% azide. Successivamente, le
10 cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 µl di PBS/0,1% di BSA/0,02% azide e analizzate su un Cantoll FACS (BD Biosciences).

Le curve di legame sono state analizzate usando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile)
15 utilizzando il Software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La **Figura 4** mostra che il legame degli anticorpi anti-AXL alle cellule HEK293 che esprimono AXL-ECD umano era simile al legame degli AXL-ADC.

20 *Esempio 6 – Citotossicità in vitro indotta dai coniugati anticorpo specifico per AXL-farmaco*

Cellule LCLC-103H (cancro polmonare umano a grandi cellule) sono state coltivate in RPMI 1640 con L-glutamina (Cambrex; Cat.No. BE12-115F) integrato con 10% (vol/vol) di siero di vitello cosmico
25 inattivato al calore (Perbio; cat. n. SH30087.03), L-glutamina 2 mM

GEN014ESM

(Cambrex; cat.n. US17-905C), penicillina 50 UI/mL e streptomina 50 µg/mL (Cambrex; cat. n. DE17-603E). Cellule MDA-MB-231 (cancro mammario umano) sono state coltivate in DMEM (Cambrex; cat. n. BE12-709F) integrato con 10% (vol/vol) di siero di vitello cosmico
5 inattivato al calore (Perbio; n. cat. SH30087.03), 1 mM di piruvato di sodio (Cambrex; n. cat. BE13-115E), L-glutammina 2 mM (Cambrex; n. cat. US17-905C), 100 mM MEM NEAA (Invitrogen; Cat.No. 11140), penicillina 50 UI/mL e streptomina 50 µg/mL (Cambrex; n. cat. DE17-603E). Le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in un
10 incubatore con umidificazione a CO₂ al 5% (vol/vol). Le cellule LCLC-103H e MDA-MB-231 sono state coltivate quasi a confluenza, dopo di che le cellule sono state tripsinizzate, risospese in mezzo di coltura e passate attraverso un setaccio cellulare (BD Falcon, n. cat. 352340) per ottenere una sospensione a singola cellula. 1x10³ cellule sono state
15 seminate in ciascun pozzetto di una piastra per coltura a 96 pozzetti, e le cellule sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente per 5 ore a 37°C, 5% CO₂ per consentire l'adesione alla piastra.

Diluizioni seriali (4 volte; concentrazioni finali che variano tra
20 0,00015 e 10 µg/mL) di coniugati anticorpo contro AXL-farmaco (AXL-ADC; si veda Esempio 1) sono stati preparati in mezzo di coltura e aggiunti alle piastre. L'incubazione di cellule con staurosporina 1µM (# S6942-200, Sigma) è stata usata come riferimento per l'uccisione al 100% delle cellule tumorali. Le cellule non trattate sono state usate
25 come riferimento per uccisione allo 0% di cellule tumorali. Le piastre



sono state incubate per 5 giorni a 37°C, 5% di CO₂. Successivamente, il reagente CellTiter-Glo (Promega; cat.no. G7571) è stato aggiunto ai pozzetti (20 µL per pozzetto) e le piastre sono state incubate per 1,5 ore a 37°C, 5% di CO₂. Successivamente, 180 µL per pozzetto sono stati trasferiti su piastre Optiplate™ bianche a 96 pozzetti (PerkinElmer, Waltham, MA; n.cat. 6005299), che sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, la luminescenza è stata misurata su un lettore multipiastra EnVision (Envision, Perkin Elmer).

AXL-ADC IgG1-AXL-148-vcDuo3, IgG1-AXL-183-vcDuo3 e IgG1-AXL-726-vcDuo3 hanno indotto citotossicità in cellule LCLC-103H, con valori IC₅₀ compresi tra 0,01 e 0,06 µg/mL, come mostrato in **Figura 5A**. Allo stesso modo, la **Figura 5B** mostra che questi AXL-ADC hanno indotto citotossicità delle cellule MDA-MB-231 con valori IC₅₀ compresi tra 0,005 e 0,015 µg/mL.

Esempio 7 - Varianti di VH e VL dell'anticorpo che consentono il legame a AXL

Le sequenze proteiche delle regioni VH e VL del pannello di anticorpi anti-AXL (descritte nell'Esempio 1) sono state allineate e confrontate per il legame a AXL per identificare i cambiamenti critici o permissivi dei residui amminoacidici nelle regioni VH o VL. Pertanto, gli anticorpi con regioni VH o VL identiche sono stati raggruppati e confrontati per il legame a AXL umano e per le differenze nelle sequenze VL o VH, rispettivamente. Il legame a AXL umano espresso transientemente dalle cellule HEK-293F è stato valutato nel saggio di screening omogeneo specifico per l'antigene come descritto nell'Esempio



1. La numerazione delle posizioni degli amminoacidi per gli allineamenti eseguiti nel presente esempio sono state eseguite in base alle sequenze riportate in **Figura 6**, cioè il primo amminoacido nella sequenza mostrata è stato numerato come posizione "1", il secondo come
5 posizione "2", ecc.

Innanzitutto, sono stati raggruppati gli anticorpi con identiche sequenze VL.

È stato trovato che IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-140 avevano una sequenza VL identica e mostravano una differenza di 1
10 amminoacido nella regione CDR3 di HC (F per I nella posizione amminoacidica 109; **Figura 6A**). Entrambi gli anticorpi si legavano all'AXL umano (Tabella 10), indicando che l'amminoacido in posizione 109 non è essenziale per il legame dell'anticorpo, supponendo che una mutazione identificata nella regione CDR2 (G per A nella posizione
15 amminoacidica 56) non compensa la perdita di legame (**Figura 6A**).

È stato trovato che IgG1-AXL-726 e IgG1-AXL-187 avevano una sequenza VL identica e che entrambi gli anticorpi si legavano a AXL umano (Tabella 10). Due cambiamenti di residui amminoacidici nella regione CDR3 di HC (R per S in posizione 97 e A per T in posizione 105;
20 **Figura 6B**) sono stati ammessi senza perdere il legame, supponendo che le mutazioni identificate nel CDR1 (Y per H nella posizione 32) e / o nelle regioni "framework" (P3Q, V24I, Y25D, T86A e T117A) non compensano la perdita di legame (**figura 6B**).

È stato trovato che IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-172 e IgG1-AXL-
25 181 avevano una sequenza VL identica e che tutti gli anticorpi si



legavano a AXL umano (Tabella 10). Le regioni CDR3 di questi tre anticorpi erano identiche, ma un cambiamento dei residui amminoacidici nel CDR1 di HC (S per N nella posizione 31) o nella regione “framework” (H per Q nella posizione 82) era consentito senza
5 perdere il legame (**Figura 6C**).

È stato trovato che IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-608-01, IgG1-AXL-610-01 e IgG1-AXL-620-06 avevano una sequenza VL identica, e mostravano una differenza amminoacidica nella regione CDR3 di HC (N per D nella posizione amminoacidica 101; **Figura 6D**). Tutti gli anticorpi
10 si legavano all'AXL umano (Tabella 10), indicando che l'amminoacido in posizione 101 non è essenziale, supponendo che le mutazioni identificate nel CDR2 di HC (V per A nella posizione 58) e/o nelle regioni “framework” (N35S, M37V, A61V, L70I, S88A) non compensano la perdita di legame (**Figura 6D**).

15 Successivamente, sono stati raggruppati gli anticorpi con sequenze VH identiche.

È stato trovato che IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-613-08 avevano una sequenza VH identica e mostravano cinque differenze amminoacidiche nella regione CDR3 del LC (RSNWL per YGSSY nelle
20 posizioni da 92 a 96; **Figura 6E**). Entrambi gli anticorpi si legavano ad AXL umano (Tabella 10), indicando che la variazione di posizioni amminoacidiche è consentita nelle posizioni da 92 a 96 e non influenza il legame con gli anticorpi, supponendo che le mutazioni identificate nel CDR1 (delezione della S in posizione 30), CDR2 (G51D), e/o nelle regioni
25 “framework” (G9A, S54N, R78S, Q100G, L104V) non compensano la



perdita di legame (**Figura 6E**).

Tabella 10

Anticorpo	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Legame massimo (unità arbitrarie)
IgG1-AXL-140	0,0026	2889
IgG1-AXL-148	0,0036	3499
IgG1-AXL-171	0,003	2575
IgG1-AXL-172	0,0055	5378
IgG1-AXL-181	0,008	3598
IgG1-AXL-187	0,0065	2563
IgG1-AXL-608-01	0,0035	3318
IgG1-AXL-610-01	0,0023	2947
IgG1-AXL-613	0,0072	5211
IgG1-AXL-613-08	0,0242	2209
IgG1-AXL-620-06	0,0034	4352
IgG1-AXL-726	0,0471	3154

Esempio 8 - Citotossicità in vitro indotta da anticorpi contro AXL coniugati a MMAE

5 Coniugazione di MMAE a anticorpi anti-AXL

Gli anticorpi anti-AXL sono stati purificati mediante cromatografia su proteina A secondo procedure standard e sono stati coniugati a vcMMAE. Il vcMMAE linker-farmaco è stato alchilato alle cisteine degli anticorpi ridotti secondo procedure descritte in letteratura (si veda Sun et al., 2005; McDonagh et al., 2006; e Alley et al., 2008). La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di un eccesso di N-acetilcisteina. Qualsiasi residuo di farmaco non coniugato è stato rimosso mediante purificazione e i coniugati finali di anticorpo anti-AXL

farmaco sono stati formulati in PBS. I coniugati anticorpo anti-AXL farmaco sono stati successivamente analizzati per la concentrazione (mediante assorbanza a 280 nm), il rapporto farmaco-anticorpo (DAR) mediante cromatografia in fase inversa (RP-HPLC) e cromatografia ad interazione idrofobica (HIC), la quantità di farmaco non coniugato (mediante cromatografia in fase inversa), aggregazione percentuale (mediante cromatografia ad esclusione dimensionale, SEC-HPLC) e i livelli di endotossina (mediante LAL). I risultati sono mostrati di seguito nella **Tabella 11**.

10 *Tabella 11 - Panoramica delle diverse caratteristiche dei coniugati anticorpo-farmaco*

Saggio	ADC									
	IgG1-AXL-107	IgG1-AXL-148	IgG1-AXL-154-M103L	IgG1-AXL-171	IgG1-AXL-183-N52Q	IgG1-AXL-511	IgG1-AXL-613	IgG1-AXL-726-M101L	IgG1-AXL-733	IgG1-b12
Concentrazione (mg/mL)	7,18	9,63	6,57	3,69	6,71	5,77	6,17	7,37	7,71	1,58
DAR mediante HIC	3,97	3,96	3,71	3,65	3,92	3,87	4,23	4,12	4,08	4,00
% anticorpo non coniugato	4,68	5,58	6,13	7,11	8,68	8,35	5,13	4,99	3,74	1,89
% aggregato mediante SEC-HPLC	6,3	2,28	2,9	3,3	5,2	5,1	6,4	4,0	3,5	2,5
Endotossina (EU/mg)	2,3	1,2	2,6	3,1	5,9	4,5	2,0	3,6	7,6	11,5

Coltura cellulare

Cellule LCLC-103H (cancro polmonare umano a grandi cellule) e cellule A431 (DMSZ, Braunschweig, Germania) sono state coltivate in RPMI 1640 con L-glutammina (Cambrex; n. cat. BE12-115F) integrato con 10% (vol / vol) di siero di vitello cosmico inattivato al calore (Perbio; n. cat. SH30087.03), L-glutammina 2 mM (Cambrex; n. cat. US17-

905C), 50 UI/mL di penicillina e streptomina 50 µg/ml (Cambrex; n. cat. DE17-603E). Cellule MDA-MB231 sono state coltivate in DMEM con alto glucosio e HEPES (Lonza #BE12-709F), siero bovino donatore con ferro (Life Technologies # 10371-029), L-glutammina 2 mM (Lonza # BE17-605E), piruvato di sodio 1 mM (Lonza # BE13-115E) e soluzione di amminoacidi non essenziali MEM (Life Technologies # 11140). Le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in un incubatore con umidificazione a CO₂ al 5% (vol/vol). Le cellule LCLC-103H, A431 e MDA-MB231 sono state coltivate quasi a confluenza, dopo di che le cellule sono state tripsinizzate, risospese in mezzo di coltura e passate attraverso un setaccio cellulare (BD Falcon, n. cat. 352340) per ottenere una sospensione a singola cellula. 1x10³ cellule sono state seminate in ciascun pozzetto di una piastra di coltura da 96 pozzetti e le cellule sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente per 5 ore a 37°C, 5% CO₂ per consentire l'adesione alla piastra.

Test di citotossicità

Diluizioni seriali (concentrazioni finali che variano tra 0,00015 e 10 µg/mL) di anticorpi contro AXL coniugati a MMAE sono stati preparati in mezzo di coltura e aggiunti alle piastre. L'incubazione di cellule con staurosporina 1 µM (# S6942-200, Sigma) è stata usata come riferimento per l'uccisione del 100% delle cellule tumorali. Le cellule non trattate sono state utilizzate come riferimento per la crescita cellulare al 100%. Le piastre sono state incubate per 5 giorni a 37°C, 5% CO₂. Successivamente, è stato aggiunto il reagente CellTiter-Glo



(Promega; n. cat. G7571) nei pozzetti (20 µL per pozzetto) e le piastre sono state incubate per 1,5 ore a 37°C, 5% CO₂. Successivamente, 180 µl per pozzetto sono stati trasferiti su piastre OptiplatTM bianche a 96 pozzetti (PerkinElmer, Waltham, MA; n. cat. 6005299), che sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, la luminescenza è stata misurata su un lettore multipiastra EnVision (Envision, Perkin Elmer).

Gli anticorpi contro AXL coniugati a MMAE hanno indotto il 50% della morte cellulare in cellule LCLC-103H a concentrazioni tra 0,004 e 0,219 µg/mL come mostrato in **Tabella 12** e **Figura 7**.

Allo stesso modo, gli AXL-ADC hanno indotto in modo efficiente la citotossicità in cellule A431 (**Tabella 13** e **Figura 15A**) e in cellule MDA-MB231 (**Tabella 13** e **Figura 15B**).

Tabella 12 - Citotossicità di anticorpi contro AXL coniugati a MMAE in cellule LCLC-103H (valori EC50)

ADC	EC50 (µg/mL)
IgG1-AXL- 613-vcMMAE	0,004
IgG1-AXL- 148-vcMMAE	0,012
IgG1-AXL- 171-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL- 726-M101L-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL- 107-vcMMAE	0,022
IgG1-AXL- 511-vcMMAE	0,032
IgG1-AXL- 154-M103L-vcMMAE	0,044
IgG1-AXL- 183-N52Q-vcMMAE	0,113
IgG1-AXL- 733-vcMMAE	0,219

Tabella 13. Citotossicità di anticorpi contro AXL coniugati con MMAE in cellule A431 e MDA-MB-231 (valori EC50).

ADC	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	A431 (n=3)		MDA-MB231 (n=2)	
	Media	s.d.	Media	s.d.
IgG1-AXL-107-vcMMAE	0,154	0,066	0,037	0,005
IgG1-AXL-148-vcMMAE	0,070	0,013	0,012	0,004
IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE	0,719	0,091	0,396	0,195
IgG1-AXL-171-vcMMAE	0,206	0,074	0,035	0,006
IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE	1,157	0,160	0,139	0,028
IgG1-AXL-511-vcMMAE	0,093	0,020	0,052	0,003
IgG1-AXL-613-vcMMAE	0,109	0,078	0,005	0,001
IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE	0,270	0,157	0,022	0,002
IgG1-AXL-733-vcMMAE	1,253	0,228	0,881	0,182

Esempio 9 – Trattamento terapeutico di xenotrapianti di tumore LCLC-103H in topi SCID con anticorpi anti-AXL coniugati a MMAE

L'efficacia *in vivo* degli anticorpi anti-AXL coniugati a MMAE è stata determinata in tumori di xenotrapianti sottocutanei (SC) LCLC-103H stabiliti in topi SCID. 5×10^6 cellule tumorali (cancro polmonare a grandi cellule) LCLC-103H (ottenute da Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) in 200 μl di PBS sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco destro dei topi SCID femmine. A partire da 14-21 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, quando la dimensione media del tumore era $>100-200 \text{ mm}^3$ e si osservava una distinta crescita tumorale, è stata somministrata una singola iniezione con 1 mg/kg (20 $\mu\text{g}/\text{topo}$) di anticorpi IgG1-AXL-vcMMAE (come descritto nell'esempio supplementare 1) o di controllo (IgG1-b12 non coniugato) per via intraperitoneale (100 $\mu\text{L}/\text{topo}$). Il volume del tumore è stato determinato almeno due volte alla settimana. I volumi tumorali (mm^3) sono stati



calcolati dalle misurazioni di calibro (PLEXX) come: 0,52 x (lunghezza) x (larghezza)².

Il pannello di anticorpi anti-AXL-vcMMAE ha mostrato una vasta gamma di attività antitumorale nei tumori stabiliti SC LCLC 103H
5 **(Figura 8)**. I cloni IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE hanno indotto una regressione tumorale, i cloni AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE e IgG1-AXL-613-vcMMAE hanno indotto una inibizione della crescita tumorale, e cloni IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-
10 M101L-vcMMAE hanno mostrato nessuna o solo una minore inibizione della crescita tumorale.

L'analisi statistica dell'ultimo giorno in cui tutti i gruppi erano intatti (giorno 30) usando One Way ANOVA (cofronti multipli di Dunnett del test rispetto al controllo IgG1- b12) ha indicato una differenza molto
15 significativa ($p < 0,0001$) nel volume del tumore tra IgG1-b12 rispetto a IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE. Il trattamento con questi cloni ha portato alcuni topi all'interno di questi gruppi per completare la riduzione del tumore. Il trattamento con i cloni IgG1-AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE
20 e IgG1-AXL-613-vcMMAE ha anche mostrato una significativa inibizione della crescita tumorale rispetto a IgG1-b12, ma le differenze erano meno pronunciate (da $p < 0,05$ a $p < 0,001$). La crescita tumorale dei topi trattati con i cloni IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE non era
25 significativamente influenzata rispetto al controllo IgG1-b12.



L'attività antitumorale degli anticorpi anti-AXL-vcMMAE è stata osservata in vari altri modelli tumorali *in vivo*. In due modelli di xenotrapianto derivati dalla linea cellulare (A431; adenocarcinoma epidermoide e MDA-MB-231; cancro mammario) gli anticorpi anti-
5 AXLvcMMAE hanno indotto l'inibizione della crescita tumorale e la regressione del tumore è stata indotta dagli anticorpi anti-AXL-vcMMAE in due modelli di xenotrapianto derivati da pazienti, di pazienti con cancro del pancreas e cancro cervicale.

*Esempio 10 - Efficacia antitumorale di AXL-ADC in un modello
10 di xenotrapianto derivato da un paziente (PDX) con tumore al pancreas, con espressione eterogenea del bersaglio*

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE è stata determinata nel modello PDX di cancro del pancreas PAXF1657 (esperimenti condotti da
15 Oncotest, Friburgo, Germania). Il tessuto tumorale del pancreas umano è stato impiantato per via sottocutanea nel fianco sinistro di topi femmina nu/nu NMRI di 5-7 settimane. La randomizzazione degli animali è stata eseguita come segue: gli animali recanti un tumore con un volume compreso tra 50 e 250 mm³, preferibilmente 80-200 mm³,
20 sono stati distribuiti in 7 gruppi sperimentali (8 animali per gruppo), considerando una mediana comparabile e la media del volume tumorale di gruppo. Al giorno della randomizzazione (giorno 0), i 3 ADC sono stati somministrati per via endovenosa (i.v.) a 4 mg/kg o 2 mg/kg e il gruppo di controllo ha ricevuto una singola dose di IgG1-b12 (4 mg/kg). I
25 volumi tumorali (mm³) sono stati monitorati due volte a settimana e



sono stati calcolati dalle misurazioni di calibro (PLEXX) come: 0,52 x (lunghezza) x (larghezza)².

La colorazione dei tumori PAXF1657 è stata eseguita con tecniche immunohistochimiche standard. Brevemente, i tessuti congelati sono stati fissati con acetone per 10 minuti e la perossidasi endogena è stata esaurita usando idrogeno perossidasi. Successivamente, le sezioni di tessuto sono state bloccate con siero di topo normale e la colorazione è stata eseguita mediante incubazione con 5 µg/mL di un pool di 5 anticorpi IgG1-AXL (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726). Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (HRP), HRP è stato visualizzato con amminoetil-carbazolo (AEC; risultante in un colore rosso). Ogni vetrino è stato contro-colorato con ematossilina (blu) per identificare i nuclei ed è stato coperto con un vetrino copri-oggetti in glicergel. I vetrini di tessuto immunocolorato sono stati digitalizzati al microscopio manuale Zeiss (AxioSkop) con ingrandimenti 10x e 40x.

La **Figura 9** mostra l'espressione eterogenea di AXL nei tumori PAXF1657. Mentre si osserva una forte colorazione per AXL in alcune cellule tumorali, altre cellule non mostrano colorazione per AXL. Nella foto in bianco e nero, la colorazione per AXL appare grigio scuro. La colorazione dell'ematossilina (nuclei) appare come grigio chiaro.

La **Figura 10A** mostra che il trattamento di topi con 2 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE ha ridotto significativamente la crescita dei tumori PAXF1657 rispetto al gruppo di controllo. Alla dose di 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-



vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE hanno indotto una regressione tumorale dei tumori PAXF1657. Il giorno 14 dopo il trattamento, la dimensione media del tumore nei topi che erano stati trattati con 2 mg/kg o 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-MMAE, IgG1-
5 AXL-148-MMAE o IgG1-AXL-733-MMAE era significativamente più piccola rispetto ai topi che erano stati trattati con un controllo isotipico IgG (IgG1-b12) ($p < 0,001$; test di confronto multiplo di Tukey).

Il trattamento dei topi con IgG1-AXL-148 non coniugato non ha comportato un'attività antitumorale nel modello PAXF1657 (**Figura**
10 **10B**). IgG1-AXL-148-vcMMAE coniugato, tuttavia, ha indotto l'attività antitumorale in modo dose-dipendente in questo modello (**Figura 10B**), illustrando che la capacità terapeutica degli AXL-ADC è dipende dall'attività citotossica di MMAE.

Inoltre, il trattamento dei topi con ADC IgG1-b12-vcMMAE
15 non bersagliato non ha mostrato attività antitumorale nel modello PAXF1657 (**Figura 10C**), illustrando che la capacità terapeutica degli AXL-ADC dipende anche dal legame specifico al bersaglio.

Esempio 11 – Anticorpi contro AXL che si legano al dominio Ig1

La specificità per i domini di AXL degli anticorpi contro AXL
20 IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 è stata determinata utilizzando un pannello di mutanti di AXL chimerici umano-murini. L'anticorpo monoclonale YW327.6S2 contro AXL cross-reattivo umano-murino è stato incluso per confermare l'espressione di hsAXL-mmECD. IgG1-b12 è stato incluso come anticorpo di controllo
25 isotipico. Cinque diverse molecole chimeriche di AXL sono state

generate ed espresse in HEK293F come descritto in Esempio 3. In breve, il dominio I simile a Ig umano (Ig1), il dominio II simile a Ig (Ig2), il dominio I simile a FNIII umano (FN1) o il dominio II simile a FNIII umano (FN2) sono stati sostituiti con i loro omologhi murini. Il legame
5 di 1 µg/mL di anticorpo anti-AXL alle chimere di AXL umano-murino è stato determinato mediante citometria a flusso, come descritto nell'Esempio 2.

Tutti gli anticorpi anti-AXL hanno mostrato un legame con AXL umano (**Figura 11A**), mentre il legame è stato abrogato quando
10 l'ECD di AXL umano è stato sostituito con il suo omologo murino (**Figura 11B**). Come previsto, l'anticorpo monoclonale YW327.6S2 contro AXL cross-reattivo umano-murino ha mostrato un legame con hsAXL-mmECD, confermando la corretta espressione di hsAXLmmECD.

Gli anticorpi contro AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-
15 AXL-137 e IgG1-AXL-613 hanno mostrato un legame fortemente ridotto a hsAXL-mmIg1 (**Figura 11C**), illustrando il riconoscimento di un epitopo nel dominio Ig1 di AXL. In linea con questo, il legame di IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 a hsAXL-mmIg2 (**Figura 11D**), hsAXLmmFN1 (**Figura 11E**) o hsAXL-mmFN2
20 (**Figura 11F**) non è stato influenzato. L'anticorpo monoclonale YW327.6S2 contro AXL cross-reattivo umano-murino ha mostrato un legame con tutte le varianti chimeriche AXL, confermando la corretta espressione di queste proteine.

*Esempio 12 - Gli anticorpi contro AXL IgG1-AXL-107 e IgG1-
25 AXL-613 si legano al dominio Ig1 ma non competono con il legame di*



Gas6

È stato testato se il legame degli anticorpi contro AXL IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 o IgG1-AXL-613 interferiva con il legame ad AXL del ligando Gas6 di AXL. Pertanto, è stato testato il
5 legame di Gas6 alle cellule A431 che erano state preincubate con 10 µg/mL di anticorpi contro AXL come descritto nell'Esempio 2. La pre-incubazione con l'anticorpo YW327.6S2 contro AXL, che è stato descritto per competere con Gas6 per il legame a AXL, IgG1-b12 (controllo isotipico) o mezzo (controllo negativo) sono stati inclusi come
10 controlli.

Le curve di legame sono state analizzate usando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoideale con pendenza variabile) utilizzando il software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

15 La **Figura 12** e la **Tabella 14** mostrano che il legame di Gas6 alle cellule A431 che erano state pre-incubate con gli anticorpi IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 era simile ai controlli di IgG1-b12 e mezzo. Ciò illustra che il legame di IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 a AXL non interferisce con il legame di Gas6, come mostrato nell'Esempio 2. Il
20 legame di Gas6 alle cellule A431 è stato ampiamente ridotto in presenza di IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137 e dell'anticorpo di controllo AXL YW327.6S2 rispetto ai controlli di IgG1-b12 e mezzo.

In esperimenti in cui le cellule A431 sono state preincubate con Gas6, i valori di legame massimo di IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613
25 erano comparabili al legame anticorpale in assenza di Gas6 (il legame



massimo dopo la preincubazione di Gas6 era del 91-108% del legame senza pre-incubazione di Gas6) (**Tabella 14**). I valori di EC₅₀ per il legame di IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 con o senza pre-incubazione di Gas6 erano nello stesso intervallo o leggermente superiori dopo la preincubazione di Gas6 (**Tabella 14**), illustrando che IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 non competono con il legame di Gas6.

Simile all'anticorpo di controllo YW327.6S2, il legame di IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 alle cellule A431 è stato notevolmente ridotto in presenza di Gas6 rispetto al legame senza Gas6 (il legame massimo dopo la pre-incubazione di Gas6 era 40-43% del legame senza pre-incubazione di Gas6; **Tabella 14**). I valori EC₅₀ per IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 non potevano essere determinati correttamente dopo la pre-incubazione di Gas6 (**Tabella 14**). Ciò dimostra che IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 competono con Gas6 per il legame ad AXL.

Questi dati dimostrano che gli anticorpi che si legano al dominio Ig1 di AXL hanno un effetto differenziale sul legame con Gas6.

Tabella 14

Anticorpo	Legame degli anticorpi alle cellule A431			Legame di Gas6 alle cellule A431	
	EC50 senza Gas6 EC50 (µg/mL) media (s.d.)	EC50 in presenza di Gas6 (µg/mL) media (s.d.)	Legame massimo in presenza di Gas6 (% di legame in assenza di Gas6) media (s.d.)	EC50 in presenza di anticorpi contro AXL (µg/mL) media (s.d.)	Legame massimo in presenza di anticorpi contro AXL (% di legame in presenza dell'anticorpo di controllo) media (s.d.)
IgG1-AXL-061	0,15 (n.a.)	n.a.	43 (28)	n.a.	22 (8)
IgG1-AXL-107	0,16 0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-137	0,11 0,10)	n.a.	40 (18)	n.a.	36 (4)
IgG1-AXL-613	0,09 0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)

YW327.6S2	0,09 0,09)	1,90 (1,04)*	41 (24)	5,53 (7,09)*	17 (10)
b12	n.a. ^a	n.a.	n.a.	0,40 (0,11)	100

^an.a., non applicabile

* valori di EC50 meno accurati a causa di un legame ridotto

Esempio 13 - Efficacia antitumorale in vivo degli AXL-ADC in modelli di xenotrapianto con e senza produzione di Gas6 autocrino (endogeno)

Produzione di Gas6 di cellule tumorali A431 e LCLC-103H

È stato testato se le cellule A431 e le cellule LCLC-103H producono Gas6. Pertanto, le cellule sono state cresciute in un mezzo di coltura completo per 3 giorni. I livelli di Gas6 nel surnatante sono stati determinati utilizzando il “Quantikine Human Gas6 ELISA” (R&S Systems, Minneapolis, MN) secondo le istruzioni del produttore. Questo saggio utilizza la tecnica dell’ELISA sandwich quantitativo. Un anticorpo monoclonale specifico per Gas6 umano è stato pre-rivestito su una micropiastra. Standard e campioni sono pipettati nei pozzetti e qualsiasi Gas6 umano presente è legato dall’anticorpo immobilizzato. Dopo aver lavato via qualsiasi sostanza non legata, ai pozzetti è stato aggiunto un anticorpo policlonale specifico per Gas 6 umano, legato ad un enzima. Dopo un lavaggio per rimuovere qualsiasi reagente di enzima-anticorpo non legato, è aggiunto un substrato ai pozzetti e il colore si sviluppa in proporzione alla quantità di Gas6 umano legata nella fase iniziale. Lo sviluppo del colore è interrotto ed è misurata l’intensità del colore.

È stato trovato che il mezzo di coltura cellulare condizionato mediante cellule A431Si contiene 2576 ng/mL di Gas6, mentre la concentrazione di Gas6 in mezzo condizionato mediante cellule LCLC-

103H era più di 20 volte inferiore (**Tabella 15**).

Tabella 15- La produzione di Gas6 nel mezzo condizionato di cellule tumorali

Linea cellulare	Gas6 nel surnatante (ng/mL)
LCLC-103H	126
A431	2576

Attività antitumorale di AXL-ADC *in vivo*

5 L'attività antitumorale *in vivo* di IgG1-AXL-061-vcMMAE (legante Ig1), IgG1-AXL-107-vcMMAE (legante Ig1), IgG1-AXL-137-vcMMAE (legante-Ig1), IgG1 -AXL-148-vcMMAE (legante-Ig2), IgG1-AXL-183-vcMMAE (legante-FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (legante-FN2) è stata determinata nel modello tumorale A431 (carcinoma epidermoide),
10 che produce alti livelli di Gas6, e nel modello tumorale LCLC-103H (carcinoma polmonare a grandi cellule), che produce bassi livelli di Gas6.

L'induzione del tumore è stata eseguita mediante iniezione sottocutanea di 5×10^6 di cellule tumorali A431 o LCLC-103H (entrambe
15 ottenute da Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) in 200 μ l di PBS nel fianco destro dei topi SCID femmine. Il trattamento è stato iniziato 14-21 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, quando la dimensione media del tumore era $> 100-200 \text{ mm}^3$ ed è stata osservata
20 una crescita distinta del tumore. I topi hanno ricevuto una singola iniezione o un totale di 4 iniezioni intraperitoneali bisettimanali con ADC IgG1-AXL-vcMMAE o anticorpo di controllo (IgG1-b12 non



coniugato), come indicato. Il volume del tumore è stato determinato almeno due volte alla settimana. I volumi di tumore (mm³) sono stati calcolati da misure di calibro (PLEXX) come: $0,52 \times (\text{lunghezza}) \times (\text{larghezza})^2$.

5 La **Figura 13A** mostra che il trattamento di topi con 3 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE ha indotto l'inibizione della crescita dei tumori A431.

La **Figura 13B** mostra che il trattamento di topi con 3 mg/kg di IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE (legante FN1) e
10 IgG1-AXL-726-vcMMAE (legante FN2) hanno indotto l'inibizione della crescita dei tumori A431. Al contrario, i cloni IgG1-AXL-061-vcMMAE e IgG1-AXL-137-vcMMAE non hanno mostrato attività antitumorale nel modello di xenotrapianto A431.

La **Figura 14A** mostra che il trattamento di topi con 3 mg/kg
15 di IgG1-AXL-061-vcMMAE, IgG1-AXL-137-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE hanno indotto una regressione del tumore nel modello di xenotrapianto LCLC-103H. Allo stesso modo, il trattamento di topi con 1 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE o 1 mg/kg di IgG1-AXL-613-vcMMAE ha indotto la
20 regressione dei tumori LCLC-103H (**Figura 14B**).

In sintesi, tutti gli AXL-ADC hanno mostrato un'attività antitumorale nel modello di xenotrapianto LCLC-103H che produce bassi livelli di Gas6. Nel modello di xenotrapianto A431, che produce alti livelli di Gas6, l'attività antitumorale è stata osservata solo per
25 quegli AXL-ADC che non competevano con il ligando Gas6 di AXL.



Esempio 14 – Espressione di AXL in differenti indicazioni tumorali

L'espressione di AXL è stata valutata in micro-array di tessuto tumorale (TMA) incorporato nella paraffina da appena tagliato e fissato
5 nella formalina (FFPE) che comprende nuclei di tessuto di pazienti con cancro tiroideo, esofageo, ovarico, pancreatico, polmonare, alla mammella, cervicale o endometriale o melanoma maligno. I TMA sono stati ottenuti da US BioMax.

I vetrini di array tumorali FFPE sono stati deparaffinati e
10 sottoposti al recupero dell'antigene (pH 6) e la perossidasi endogena è stata esaurita mediante incubazione con 0,1% di H₂O₂ in tampone citrato/fosfato. Per rilevare l'espressione di AXL, i TMA sono stati incubati con coniglio anti-AXL (Santa Cruz, nr cat: sc-20741) ad una concentrazione di 1 µg/mL per 60 minuti (temperatura ambiente (RT)).
15 Per identificare le cellule (tumorali) di origine epiteliale, i TMA sono stati incubati con coniglio anti-citocheratina (Abcam, cat. Nr. ab9377) a una diluizione di 1:50 per 60 min (RT). Dopo una fase di lavaggio, i TMA sono stati incubati con polimero di destrano di IgG anti-coniglio coniugato a perossidasi (ImmunoLogic, n. cat.: DPVR55HRP) per
20 rilevare il legame di anticorpi di coniglio anti-AXL e anticorpi anti-citocheratina di coniglio. Infine, il legame del polimero di destrano di IgG anti-coniglio è stato visualizzato con diaminobenzidina (DAB; colore marrone; DAKO, n. cat. K346811). Nel TMA con nuclei di tessuto di melanoma maligno, il legame del polimero di destrano IgG anti-coniglio
25 è stato visualizzato con amminoetilcarbazo (AEC; colore rosso; Vector,



SK4200). I nuclei in TMA sono stati visualizzati con ematossilina (colore blu).

I TMA immunocolorati con citocheratina e gli AXL e sono stati digitalizzati con uno scanner per vetrini Aperio con ingrandimento di
5 20x e l'immunocolorazione è stata quantificata con il software di analisi di immagini dei tessuti (software Definiens Tissue Studio, versione 3.6.1), usando un algoritmo basato su cellule. L'algoritmo è stato progettato per identificare e quantificare la percentuale di cellule positive per AXL o per la citocheratina nelle biopsie (intervallo 0 - 100%)
10 e per quantificare l'intensità della colorazione di AXL nelle cellule tumorali positive per AXL (densità ottica (OD); intervallo 0 - 3) in ciascun nucleo del tumore. Le cellule tumorali sono state classificate come positive per AXL, quando l'OD di AXL era almeno 0,1. La percentuale di cellule tumorali positive per AXL per nucleo tumorale
15 (intervallo 0 - 100%) è stata calcolata dividendo il numero totale delle cellule positive per AXL per il numero totale di cellule positive alla citocheratina nei nuclei tumorali sequenziali. L'intensità (OD) media di colorazione di AXL in ciascun nucleo del tumore è stata calcolata dividendo la somma di OD di AXL di tutte le cellule tumorali positive per
20 AXL per il numero di cellule tumorali positive per AXL.

L'array tumorale da pazienti con melanoma maligno è stato valutato manualmente. L'intensità di colorazione di AXL è stata valutata come debole (1+), moderato (2+) o forte (3+) e la percentuale di cellule con melanoma positivo per AXL è stata valutata in intervalli in 10%
25 (intervallo 0 - 100%).



La **Figura 16** fornisce una rappresentazione grafica dell'espressione di AXL nei nuclei tumorali di tumore tiroideo, esofageo, ovarico, mammario, polmonare, pancreatico, cervicale ed endometriale. La **tabella 16** mostra la percentuale di nuclei tumorali che mostrava l'espressione di AXL in oltre il 10% delle cellule tumorali, per ciascuna indicazione. La **Figura 17** mostra un esempio rappresentativo di un nucleo tissutale immunocolorato per AXL, per ciascuna indicazione. Le figure illustrano l'espressione eterogenea di AXL nel tessuto tumorale.

Tabella 16

Indicazione del tumore	Sottotipo	% di nuclei tumorali (pazienti) con >10% di cellule tumorali positive per AXL
Cancro esofageo	Adenocarcinoma (n=19)	73
	Carcinoma a cellule squamose (n=60)	55
Cancro ovarico	Tutti i sottotipi (n=52)	90
Cancro pancreatico	Tutti i sottotipi (n=58)	60
Cancro polmonare (NSCLC)	Carcinoma a cellule squamose SSC (n=52)	63
	Adenocarcinoma (n=48)	67
Cancro polmonare (SCLC)	SCLC (n=5)	60
Cancro tiroideo	Tutti i sottotipi (n=48)	92
Cancro uterino	Tutti i sottotipi (n=60)	88
Cancro mammario	TNBC (n=54)	24
Cancro cervicale	Tutti i sottotipi (n=54)	93
Melanoma	Melanoma maligno (n=67)	6

Abbreviazioni utilizzate: NSCLC, cancro polmonare non a piccole cellule; SCLC, cancro polmonare a piccole cellule; TNBC, cancro mammario triplo negativo

10 *Esempio 15 – Anticorpi contro AXL che legano specificamente AXL ma non altri membri della famiglia di recettori TAM*

Espressione di AXL, MER e TYRO3 umani in cellule HEK-293F

Sono stati generati i seguenti costrutti ottimizzati per codone per l'espressione di varie proteine a lunghezza intera: AXL (accesso di Genbank n. NP_O68713.2) umano (Homo sapiens), MER umano (accesso di Genbank n. EAW52096.1, e TYRO3 umano (n. di accesso di Genbank Q06418.1). I costrutti contenevano idonei siti di restrizione per il clonaggio e una sequenza ottimale di Kozak (GCCGCCACC) (Kozak et al., 1999). I costrutti sono stati clonati nel vettore di espressione di mammiferi pcDNA3.3 (Invitrogen).

Cellule Freestyle™ 293-F (un subclone HEK-293 adattato alla crescita in sospensione e al mezzo chimicamente definito Freestyle (HEK-293F)) sono state ottenute da Invitrogen e trasfettate con i plasmidi d'espressione usando 293fectina (Invitrogen), secondo le istruzioni del produttore e sono state cresciute per 24-48 ore.

Studio di legame degli anticorpi contro AXL verso AXL umano, MER umano o TYRO3 umano

Cellule HEK-293F trasfettate transientemente con i costrutti di espressione per AXL, MER o TYRO3 umani a lunghezza intera sono state valutate per il legame degli anticorpi HuMab-AXL mediante citometria a flusso. Le cellule trasfettate HEK-293F sono state incubate con diluizioni seriali di anticorpi contro AXL (diluizioni di 4 volte; intervallo di concentrazione finale 0,002-10 µg/mL) per 30 minuti a 4°C. Dopo aver lavato tre volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, le cellule sono state incubate con F(ab')₂ di IgG di capra-anti-umano coniugato con R-ficoeritrina(PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania; n. cat. 109-116-098) diluito 1/100 in



PBS/0,1% BSA/0,02% azide (volume finale 100 μ L). Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 μ l di PBS/0,1% di BSA/0,02% azide e analizzate su un Cantoll FACS (BD Biosciences). La colorazione con Mer murino anti-umano (R&D Systems, cat. Mab8912) e Tyro3 murino anti-umano (Dtk) (R&S Sistemi, cat. MAB859) è stata inclusa come controllo per l'espressione, IgG1-b12 è stato incluso come anticorpo di controllo isotipico che non si lega. Le curve di legame sono state analizzate usando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoideale con pendenza variabile) utilizzando il software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La **Figura 18A** mostra che gli anticorpi Humab-AXL hanno mostrato un legame dose-dipendente alle cellule HEK293 che esprimevano AXL umano. Al contrario, è stato osservato nessun legame degli anticorpi HuMab-AXL alle cellule che esprimono MER (**Figura 18B**) o TYRO3 (**Figura 18C**) o alle cellule HEK293 non trasfettate (**Figura 18D**). La colorazione con anticorpi specifici per MER e Tyro3 ha confermato che le cellule trasfettate hanno mostrato la corretta espressione di MER (**Figura 18F**) o TYRO3 (**Figura 18G**), rispettivamente.

Esempio 16 – Internalizzazione degli anticorpi contro AXL legati alla superficie cellulare

Interiorizzazione di HuMab-AXL legato alla superficie cellulare valutata mediante citometria a flusso

L'interiorizzazione degli anticorpi HuMab-AXL legati alla

superficie cellulare alle cellule MDA-MB-231 e Calu-1 (linea cellulare di carcinoma polmone umano; ATCC, n. cat. HTB-54) è stata valutata mediante citometria a flusso. 50.000 cellule sono state seminate in piastre di coltura tissutale da 96 pozzetti e lasciate ad attaccare per 6
5 ore a 37°C. Le piastre sono state incubate a 4°C per 30 minuti prima dell'incubazione con diluizioni seriali di anticorpi contro AXL (intervallo di concentrazione finale 0,0032-10 µg/mL) a 4°C per 1 ora. Successivamente, il mezzo è stato sostituito dal mezzo di coltura tissutale senza anticorpo e le cellule sono state incubate durante la
10 notte (16-18 ore) a 37°C o 4°C. Successivamente, le cellule sono state staccate con 40 µL di soluzione di tripsina calda, lavate con PBS/0,1% BSA/0,02% azide ghiacciato e incubate per 30 minuti a 4°C con F(ab')₂ di IgG di capra anti-umano coniugato a R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat. n. 109-116-
15 098) diluito 1/100 in PBS/0,1% BSA/0,02% azide (volume finale 100 µL), per rilevare gli anticorpi contro AXL sulla superficie cellulare. Infine, le cellule sono state lavate due volte in PBS/0,1% BSA/0,02% azide, risospese in 120 µl di PBS/0,1% BSA/0,02% azide e analizzate su un Cantoll FACS (BD Biosciences).

20 Le curve di legame sono state analizzate usando la regressione non lineare (dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile) usando il software GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

25 La **Figura 19** mostra che, per tutti gli anticorpi HuMab contro AXL e a tutte le concentrazioni testate, è stato rilevato più anticorpo



sulla membrana plasmatica delle cellule che erano state incubate a 4°C dopo il legame degli anticorpi, rispetto alle cellule che erano state incubate a 37°C. Ciò illustra che, a 37°C, gli anticorpi contro AXL sono interiorizzati dopo il legame alla membrana plasmatica.

5 Saggio di internalizzazione e degradazione intracellulare di Fab-TAMRA/QSY7

L'internalizzazione degli anticorpi contro AXL è stata valutata nel saggio di internalizzazione Fab-TAMRA/QSY7. Questo saggio utilizza una coppia di fluoroforo (TAMRA) e quencher (QSY7). In stretta
10 vicinanza, ad esempio, subito dopo la coniugazione alla stessa proteina, la fluorescenza di TAMRA viene estinta da QSY7. In questo esempio, frammenti-Fab di IgG di capra-anti-umani (Jackson ImmunoResearch) sono stati coniugati con TAMRA/QSY7 (Fab-TAMRA/QSY7) come descritto (Ogawa et al., Mol Pharm 2009; 6 (2): 386-395) e HuMab
15 contro AXL (1,5 µg/mL) sono stati preincubati con Fab-TAMRA/QSY7 (12 µg/mL; 30 min, 4°C). Il complesso è stato successivamente aggiunto alle cellule LCLC-103H e incubato per 24 ore di incubazione al buio, in condizioni di agitazione (200 rpm, 37°C). L'internalizzazione del complesso HuMab-Fab-TAMRA/QSY7 e la degradazione intracellulare
20 negli endosomi e lisosomi causano la dissociazione di TAMRA/QSY7, determinando il "dequenching" di TAMRA. La fluorescenza di TAMRA delle cellule LCLC-103H, che erano state incubate con anticorpi contro AXL complessati con Fab-TAMRA/QSY7, era misurata su FACS Canto-II (BD Biosciences).

25 Come mostrato nella **Figura 20**, l'intensità della fluorescenza



delle cellule LCLC-103H è stata potenziata durante l'incubazione con il complesso anticorpo contro AXL-Fab-TAMRA/QSY7, rispetto al solo IgG1-b12-Fab-TAMRA/QSY7 o Fab-TAMRA/QSY7. Ciò dimostra che gli anticorpi contro AXL sono interiorizzati dopo il legame alle cellule LCLC-
5 103H.

Esempio 17 - Efficacia antitumorale degli AXL-ADC in un modello di xenotrapianto derivato da un paziente (PDX) con cancro esofageo

È stata valutata l'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-
10 vcMMAE (qui indicata anche come "HuMax-AXL-ADC") nel modello ESO195 di PDX esofageo sottocutaneo in topi nudi BALB/c (esperimenti condotti da Crown Bioscience. Taicang Jiangsu Province, Cina). Frammenti di tumore da topi donatori recanti gli xenotrapianti (ESO195) esofagei derivati da pazienti sono stati usati per l'inoculazione
15 in topi nudi BALB/c. Ogni topo è stato inoculato per via sottocutanea al fianco destro con un frammento di tumore (2-3 mm di diametro) e i tumori sono stati lasciati crescere fino a che il volume del tumore era di circa 150 mm³. La randomizzazione degli animali è stata eseguita come segue: gli animali recanti un tumore con un volume di circa 150 mm³
20 sono stati distribuiti in 5 gruppi sperimentali (8 animali per gruppo), considerando una mediana comparabile e una media del volume tumorale di gruppo. I gruppi di trattamento erano: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107, IgG1- AXL-107-vcMMAE e paclitaxel. Gli anticorpi e gli ADC sono stati dosati per via endovenosa (i.v.) a 4 mg/kg
25 al giorno di randomizzazione (giorno 0) e al giorno 7. Paclitaxel è stato



somministrato per via intraperitoneale (i.p.) a 20 mg/kg al giorno 0, 7 e 14. I volumi tumorali (mm³) sono stati monitorati due volte a settimana e sono stati calcolati dalle misurazioni di calibro (PLEXX) come: 0,52 x (lunghezza) x (larghezza)².

5 La **Figura 21** mostra che il trattamento di topi con IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto la regressione tumorale dei tumori ES0195 rispetto ai gruppi di controllo IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE (p <0,001 al giorno 23, test ANOVA a senso unico (“one-way”)). Il trattamento dei topi con ADC IgG1-b12-vcMMAE non bersagliato non ha mostrato attività
10 antitumorale in questo modello, illustrando che la capacità terapeutica degli AXL-ADC dipende dal legame al bersaglio specifico. I topi che sono stati trattati con paclitaxel hanno mostrato inibizione della crescita tumorale, ma questo è stato meno efficace rispetto al trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (p <0,05 al giorno 23, test ANOVA a senso
15 unico).

Esempio 18 - Efficacia antitumorale di AXL-ADC in un modello di xenotrapianto derivato da un paziente (PDX) con cancro cervicale

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE è stata valutata nel modello CEXF 773 di xenotrapianto di
20 carcinoma cervicale derivato da paziente in topi nu/nu NMRI (Harlan, Paesi Bassi). Gli esperimenti sono stati eseguiti da Oncotest (Friburgo, Germania).

I frammenti di tumore sono stati ottenuti da xenotrapianti in passaggio seriale in topi nudi. Dopo la rimozione dai topi donatori, i
25 tumori sono stati tagliati in frammenti (diametro 4-5 mm) e collocati in



PBS (con penicillina/streptomycin 10%) fino all'impianto sottocutaneo. I topi in anestesia con isofluorano hanno ricevuto impianti tumorali unilaterali e sottocutanei nel fianco. Ai tumori è stato permesso di crescere fino a quando il volume del tumore era 50-250 mm³.

5 La randomizzazione degli animali è stata eseguita come segue: gli animali recanti un tumore con un volume di 50-250 mm³ sono stati distribuiti in 4 gruppi sperimentali (8 animali per gruppo), considerando una mediana comparabile e una media del volume tumorale di gruppo. I gruppi di trattamento erano: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-
10 183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE. Gli anticorpi e gli ADC sono stati dosati per via endovenosa (i.v.) a 4 mg/kg il giorno della randomizzazione (giorno 0) e il giorno 7. I volumi dei tumori (mm³) sono stati monitorati due volte a settimana e sono stati calcolati dalle misurazioni di calibro (PLEXX) come: $0,52 \times (\text{lunghezza}) \times (\text{larghezza})^2$.

15 La **Figura 22** mostra che il trattamento dei topi con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE ha indotto la regressione dei tumori CEXF 773 rispetto ai gruppi di controllo IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE. Il trattamento di topi con ADC IgG1-b12-vcMMAE non bersagliato non ha mostrato attività antitumorale in questo modello,
20 illustrando che la capacità terapeutica degli AXL-ADC dipende dal legame al bersaglio specifico. L'analisi statistica delle dimensioni del tumore al giorno 28 (Kruskal-Wallis e Mantel-Cox usando un limite ("cut-off") della dimensione del tumore di 500 mm³), ha mostrato che la dimensione media del tumore nei topi trattati con IgG1-AXL-183-
25 vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE era significativamente più piccola



rispetto ai topi che erano stati trattati con IgG1-b12 e IgG1-b12-vcMMAE ($p < 0,001$). IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE erano ugualmente efficaci.

Esempio 19 - Efficacia antitumorale di AXL-ADC in un modello di xenotrapianto di carcinoma mammario ortotopico

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE è stata valutata in un modello di xenotrapianto MDA-MB-231 D3H2LN ortotopico.

Cellule MDA-MB-231-luc D3H2LN Bioware (adenocarcinoma della ghiandola mammaria; Perkin Elmer, Waltham, MA) sono state impiantate nel cuscinetto di grasso mammario di topi femmina SCID (C.B-17/IcrPrkdc-scid/CRL) di 6-11 settimane (Charles-River) in anestesia con isofluorano. Ai tumori è stato permesso di crescere e i topi sono stati randomizzati quando i tumori avevano raggiunto un volume di $\sim 325 \text{ mm}^3$. Poi, i topi sono stati distribuiti in 4 gruppi sperimentali (6-7 animali per gruppo), considerando una mediana equivalente e una media di volume del tumore di gruppo. I gruppi di trattamento erano: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE. Gli animali hanno ricevuto un totale di 4 dosi bisettimanali di 3 mg/kg di anticorpo o ADC a partire dal giorno della randomizzazione. I volumi tumorali (mm^3) sono stati monitorati due volte a settimana e sono stati calcolati da misure di calibro (PLEXX) come: $0,52 \times (\text{lunghezza}) \times (\text{larghezza})^2$.

La **Figura 23** mostra che il trattamento dei topi con da IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE ha indotto la regressione



tumorale dei tumori MDA-MB-231 rispetto ai gruppi di controllo IgG1-b12 e IgG1-b12-MMAE. Il trattamento dei topi con ADC IgG1-b12-vcMMAE non bersagliato non ha mostrato attività antitumorale in questo modello, mostrando che la capacità terapeutica degli AXL-ADC
5 dipende dal legame al bersaglio specifico. L'analisi statistica delle dimensioni del tumore al giorno 32 (test One Way Anova), ha mostrato che la dimensione media del tumore nei topi che erano stati trattati con IgG1-AXL-183-vcMMAE o IgG1-AXL-726-vcMMAE era significativamente più piccola rispetto ai topi che erano stati trattati con
10 IgG1-b12 e IgG1-b12-vcMMAE ($P < 0,001$). Non sono state osservate differenze tra i gruppi di trattamento IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE, illustrando che questi hanno indotto un'attività antitumorale altrettanto efficace.

Esempio 20 – La citotossicità in vitro indotta dai coniugati di anticorpo-farmaco specifici per AXL è dipende dall'espressione del bersaglio
15

La citotossicità *in vitro* di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata testata su linee cellulari tumorali umane con diversi livelli di espressione di AXL.

20 Coltura cellulare

Cellule LS174T (linea cellulare di adenocarcinoma coloretale umano; ATCC, cat no CL-188) sono state coltivate in mezzo minimo essenziale (MEM) con Glutamax, Heps e rosso fenolo (Life Technologies, cat n. 42360-024). I componenti sono 10% di siero bovino
25 donatore con ferro (DBSI) (Life Technologies, cat n. 10371-029) e 1% di



GEN014ESM

sodio piruvato (100mM; Lonza, cat no BE13-115E) e 1% di penicillina/streptomicina (Lonza, cat no DE17-603E).

Cellule NCI-H226 (carcinoma polmonare umano a cellule squamose; ATCC, cat no CRL-5826), cellule NCI-H661 (cancro polmonare umano a grandi cellule; ATCC, cat no HTB-183) e cellule NCI-H1299 (cancro polmonare umano non a piccole cellule; ATCC, cat no CRL-5803) sono state coltivate nel mezzo RPMI 1640 (modifica ATCC; Life Technologies, cat n. A10491-01). I componenti sono 10% di siero bovino donatore con ferro (DBSI; Life Technologies, cat n. 10371-029) e 1% di penicillina/streptomicina (Lonza, cat n. DE17-603E).

Cellule SKOV-3 (adenocarcinoma ovarico umano; ATCC, cat no HTB-77) sono state coltivate nel mezzo 5A di McCoy con L-glutammina e HEPES (Lonza, cat no BE12-168F). I componenti sono 10% di siero bovino donatore con ferro (DBSI; Life Technologies, cat n. 10371-029) e 1% di penicillina/streptomicina (Lonza, cat n. DE17-603E).

Cellule Calu-1 (carcinoma epidermoide polmonare umano; ATCC, cat no HTB-54) sono state coltivate in terreno 5A di McCoy con Catopeptone, senza HEPES (Life Technologies, n. cat. 26600-023). I componenti sono 10% di siero bovino donatore con ferro (DBSI; Life Technologies, cat n. 10371-029) e 1% di L-glutammina (200 nM) in soluzione di NaCl 0,85% (Lonza, cat no BE17-605F) e 1% di penicillina/streptomicina (Lonza, cat no DE17-603E). Le cellule Calu-1 sono resistenti alla terapia di bersaglio a EGFR.

Cellule LCLC-103H (cancro polmonare umano a grandi



cellule), cellule A431 (adenocarcinoma epidermoide umano) e cellule MDAMB- 231 (cancro mammario umano) sono state coltivate come descritto nell'Esempio 8.

5 Quantificazione dell'espressione di AXL sulla membrana plasmatica delle linee cellulari tumorali umane

L'espressione di AXL sulla membrana plasmatica di linee cellulari tumorali umane è stata valutata mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando QIFIKIT (DAKO, Cat nr K0078) con anticorpo monoclonale murino Z49M (Santa Cruz biotechnology, Cat nr sc-
10 73719). Le cellule aderenti sono state tripsinizzate e passate attraverso un setaccio cellulare per ottenere sospensioni di singole cellule. Le cellule sono state rese pellet mediante centrifugazione per 5 minuti a 1.200 rpm, lavate con PBS e risospese ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/mL. Le fasi successive sono state eseguite su ghiaccio. 100 μ L
15 delle sospensioni a cella singola (100.000 cellule per pozzetto) sono stati seminati in piastre a fondo tondo a 96 pozzetti in polistirene (Greiner Bio-One, Cat nr 650101). Le cellule sono state rese pellet mediante centrifugazione per 3 minuti a 300xg e risospese in 50 μ L di campione di anticorpi o di campione di controllo isotipico di IgG1 murino
20 (BD/Pharmingen, Cat nr 555746) ad una concentrazione di 10 μ g/mL.

Dopo un'incubazione di 30 minuti a 4°C, le cellule erano state rese pellet e risospese in 150 μ l di tampone FACS. Le biglie di set-up e calibrazione sono state aggiunte alla piastra secondo le istruzioni del produttore. Cellule e sfere in parallelo sono state lavate altre due volte
25 con 150 μ L di tampone FACS e risospese in 50 μ L di IgG di capra anti-



murino coniugato con FITC (1/50; DAKO, Cat nr K0078). L'anticorpo secondario è stato incubato per 30 minuti a 4°C al buio. Le cellule e le biglie sono state lavate due volte con 150 µL di tampone FACS e risospese in 100 µL di tampone FACS. L'immunofluorescenza è stata
5 misurata su FACS Canto II (BD Biosciences) registrando 10.000 eventi all'interno del "gate" delle cellule vitali. L'intensità di fluorescenza media delle biglie di calibrazione è stata utilizzata per calcolare la curva di calibrazione utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Per ciascuna linea cellulare, la capacità
10 di legare l'anticorpo (ABC), una stima del numero di molecole AXL espresse sulla membrana plasmatica, è stata calcolata usando l'intensità media di fluorescenza delle cellule colorate con anticorpo contro AXL, sulla base all'equazione della curva di calibrazione (interpolazione di incognite dalla curva standard, utilizzando il software
15 GraphPad).

Test di citotossicità

Per le cellule LCLC-103H, A431, MDA-MB-231, NCI-H226, NCI-H661, NCI-H1299, LS174T e SKOV-3, il test di citotossicità *in vitro* è stato eseguito come descritto nell'Esempio 8. Per Calu-1, il test di
20 citotossicità è stato eseguito come descritto nell'Esempio 8, con l'adattamento che le colture cellulari sono state incubate per 11 giorni anziché per 5 giorni. Le curve dose-risposta sono state generate utilizzando il software Graphpad Prism, utilizzando l'analisi di regressione non lineare. La percentuale di cellule vitali a una
25 concentrazione di IgG1-AXL-107-vcMMAE di 1 µg/mL è stata



interpolata dalle curve dose-risposta.

Come mostrato nella **Figura 24**, IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto la più potente citotossicità nelle linee cellulari con elevata espressione di AXL, mentre la citotossicità era bassa o assente nelle
5 linee cellulari con bassa espressione di AXL. La figura illustra anche che IgG1-AXL-107-vcMMAE è efficace nell'induzione della citotossicità in cellule resistenti alla terapia di bersaglio a EGFR, come Calu-1.

*Esempio 21 - Efficacia antitumorale migliorata di IgG1-AXL-107-vcMMAE in combinazione con erlotinib in un modello di xenotrapianto
10 derivato da paziente (PDX) con NSCLC.*

Modello PDX LU2511

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata valutata nel modello LU2511 sottocutaneo di PDX di NSCLC resistente all'erlotinib in topi nudi BALB/c (esperimenti condotti da Crown
15 Bioscience, Changping District, Pechino, Cina). I frammenti tumorali da topi donatori recanti xenotrapianti NSCLC derivati da paziente (LU2511) sono stati usati per l'inoculazione nei topi nudi BALB/c. Ogni topo è stato inoculato per via sottocutanea sul fianco destro con un frammento di tumore (2-3 mm di diametro) e ai tumori è stato permesso di crescere
20 fino a quando il volume del tumore era di circa 200 mm³. La randomizzazione degli animali è stata eseguita come segue: gli animali recanti un tumore con un volume di circa 200 mm³ sono stati distribuiti in 5 gruppi sperimentali (8 animali per gruppo), considerando una mediana comparabile e una media del volume tumorale di gruppo. I
25 gruppi di trattamento erano: IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-



107-vcMMAE, erlotinib ed erlotinib più IgG1-AXL-107-vcMMAE. Gli anticorpi e gli ADC sono stati dosati per via endovenosa (i.v.) a 4 mg/kg il giorno della randomizzazione (giorno 0) e il giorno 7. Erlotinib è stato somministrato per via orale (per os) a 50 mg/kg al giorno per 2
5 settimane. I volumi tumorali (mm³) sono stati monitorati due volte a settimana e sono stati calcolati dalle misurazioni di calibro (PLEXX) come: 0,5 x (lunghezza) x (larghezza)².

La **Figura 25** mostra che il trattamento dei topi con erlotinib non ha indotto attività antitumorale, come previsto. IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto l'inibizione della crescita tumorale dei tumori LU2511 rispetto i gruppi di controllo IgG1-b12 (p <0,01 al giorno 10, test ANOVA a senso unico; **Figura 25B**) e IgG1-b12-MMAE (p <0,05 al giorno 10, test ANOVA a senso unico; **Figura 25B**). Il trattamento dei topi con la combinazione di IgG1-AXL-107-vcMMAE ed erlotinib ha
15 indotto una più potente attività antitumorale rispetto a IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo in questo modello (p <0,05 al giorno 17, test ANOVA a senso unico; **Figura 25C**).

Modello PDX LU0858

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata valutata nel modello LU0858 sottocutaneo di PDX di NSCLC resistente all'erlotinib in topi nudi BALB/c (esperimenti condotti da CrownBioscience, Changping District, Pechino, Cina). L'inoculazione dei frammenti di tumore in topi nudi BALB/c e la randomizzazione è stata eseguita come descritto sopra.

25 Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) è



stato eseguito al giorno 0 e 7 dopo la randomizzazione dei gruppi (**Figura 32**). È stato anche testato il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE in combinazione con l'inibitore di EGFR erlotinib. L'erlotinib è stato somministrato quotidianamente per 14 giorni alla dose di 50 mg/kg. L'erlotinib da solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 sono stati utilizzati come controlli. Il solo erlotinib non ha avuto effetti sulla crescita tumorale. A 2 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo non ha avuto alcun effetto sulla crescita tumorale. A 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo ha indotto l'inibizione della crescita tumorale rispetto al controllo IgG1-b12-vcMMAE. La combinazione di 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE con erlotinib non ha migliorato il risultato rispetto al solo IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 32**). L'aggiunta di erlotinib al trattamento con 2 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE ha portato ad una inibizione della crescita simile al gruppo che ha ricevuto 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Modello PDX LU1868

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata valutata nel modello LU1858 sottocutaneo di PDX di NSCLC resistente all'erlotinib in topi nudi BALB/c (esperimenti condotti da CrownBioscience, Changping District, Pechino, Cina). L'inoculazione dei frammenti di tumore in topi nudi BALB/c e la randomizzazione sono state eseguite come descritto sopra.

Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) è stato eseguito al giorno 0 e 7 dopo la randomizzazione dei gruppi. È stato anche testato il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE in



combinazione con l'inibitore dell'EGFR erlotinib. L'erlotinib è stato somministrato quotidianamente per 14 giorni alla dose di 50 mg/kg. I trattamenti con erlotinib da solo, IgG1-b12-vcMMAE o IgG1-b12 erano stati inclusi come controlli (**Figura 33**).

5 L'analisi mediante test di Mann-Whitney è stata effettuata il giorno 21 per confrontare gli effetti del trattamento rispetto a IgG1-b12 o IgG1-b12-vcMMAE, il giorno 28 per confrontare gli effetti di IgG1-AXL-107-vcMMAE 2 mg/kg da solo rispetto a IgG1-AXL-107-vcMMAE 2 mg/kg in combinazione con erlotinib e il giorno 31 per confrontare gli
10 effetti di IgG1-AXL-107-vcMMAE 4 mg/kg da solo contro IgG1-AXL-107-vcMMAE 4 mg/kg in combinazione con erlotinib. L'erlotinib da solo non ha avuto effetti sulla crescita tumorale. A 2 mg/kg e 4 mg/kg, IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo ha indotto l'inibizione della crescita tumorale, mentre la combinazione di IgG1-AXL-107-vcMMAE con erlotinib non ha
15 migliorato il risultato rispetto a IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo (**Figura 33**).

Modello PDX LXFA 526

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata valutata nel modello LXFA 526 sottocutaneo di PDX di NSCLC
20 resistente all'erlotinib (esperimenti eseguiti da Oncotest, Friburgo, Germania). L'inoculazione di frammenti di tumore in topi nu/nu NMRI maschi di 4-6 settimane e la randomizzazione sono state eseguite come descritto sopra.

Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) è
25 stato eseguito al giorno 0 e 7 dopo la randomizzazione dei gruppi



(Figura 34). È stato anche testato il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE in combinazione con l'inibitore dell'EGFR erlotinib. L'erlotinib è stato somministrato quotidianamente per 14 giorni alla dose di 50 mg/kg. L'erlotinib da solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 sono stati
5 utilizzati come controllo. L'erlotinib da solo non ha avuto effetti sulla crescita tumorale. IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto l'inibizione della crescita tumorale alla dose di 2 mg/kg mentre alla dose di 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una regressione completa del tumore in tutti i topi almeno fino al giorno 76. Il trattamento combinato di
10 IgG1-AXL-107-vcMMAE a livelli di dose di 2 mg/kg o 4 mg/kg con erlotinib ha mostrato un'attività antitumorale simile rispetto a IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo (Figura 34).

Modelli PDX LXFA 677 e LXFA 677 3

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata
15 valutata nel modello LXFA 677 sottocutaneo di PDX di NSCLC e nel modello LXFA 677_3, che è derivato dal modello LXFA 677 e ha acquisito resistenza a erlotinib (esperimenti eseguiti da Oncotest, Friburgo, Germania). L'Inoculazione di frammenti di tumore in topi nu/nu maschio NMRI di 4-6 settimane e la randomizzazione sono stati
20 eseguiti come descritto sopra.

Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) è stato eseguito al giorno 0 e 7 dopo la randomizzazione dei gruppi. È stato anche testato il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE in
25 combinazione con l'inibitore dell'EGFR erlotinib. L'erlotinib è stato somministrato quotidianamente per 14 giorni alla dose di 50 mg/kg.



Erlotinib da solo, IgG1-b12-vcMMAE e IgG1-b12 sono stati usati come controlli. L'erlotinib ha indotto una regressione parziale del tumore nel modello LXFA 677 ma non ha avuto alcun effetto sulla crescita tumorale nel modello LXFA 677_3 resistente all'erlotinib, come previsto (Figura 35). IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto l'inibizione della crescita tumorale ad una dose di 2 mg/kg mentre ad una dose di 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una regressione parziale del tumore nel modello LXFA 677. Nel modello LXFA 677_3 resistente all'erlotinib, IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una regressione completa del tumore ad entrambi i livelli di dose, che è durato almeno fino al giorno 41. Nei due modelli, il trattamento combinato di IgG1-AXL-107-vcMMAE a 4 mg/kg nonché a 2 mg/kg con erlotinib hanno indotto un'attività antitumorale simile rispetto a IgG1-AXL-107-vcMMAE da solo (Figura 35).

Tabella 17. *Panoramica dei modelli PDX polmonari, stato mutazionale dell'EGFR e risposta a erlotinib e AXL-ADC.*

Modello	stato di EGFR	resistenza a Erlotinib
LU2511 ^a	WT	R
LU0858 ^b	L858R	R
LU1868 ^b	T790M/L858R	R
LXFA526	WT	R
LXFA677 ^c	WT	sensibile
LXFA677_res3 ^c	WT	R

^aYang et al. EORTC meeting 2013, Poster 493 (2013)

^bYang et al. Int. J. Cancer: 132, E74-E84 (2013)

^cTschuch et al. AACR-EORTC meeting 2015, Poster A10 (2015)

Esempio 22 - Le linee cellulari NSCLC che sono resistenti agli inibitori di EGFR erlotinib, gefitinib e afatinib mostrano un'espressione

migliorata della proteina Axl e una sensibilità potenziata a IgG1-AXL-107-vcMMAE in vitro

L'influenza della resistenza acquisita a erlotinib sull'espressione della proteina Axl in un pannello di linee cellulari NSCLC è stata valutata mediante analisi Western blot. Inoltre, le linee cellulari NSCLC sono state valutate per la loro sensibilità a IgG1-AXL-107-vcMMAE *in vitro*.

Culture cellulari e agenti antitumorali

Tutti i materiali della coltura tissutale sono stati ottenuti da Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). La linea cellulare HCC827 di adenocarcinoma NSCLC sensibile a erlotinib è stata acquistata presso l'ATCC. Le cellule HCC827 sono selvatiche per KRAS e ospitano la mutazione exon19del in EGFR (eliminazione di E746-A750), che è associata alla sensibilità a EGFR-TKI. Le cellule sono state coltivate in mezzo Glutamax RPMI-1640 integrato con siero bovino fetale al 10% (FBS) e penicillina-streptomina 50 µg/mL e mantenute in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ a 37°C. Gli inibitori di EGFR (erlotinib, gefitinib e afatinib) sono stati acquistati da Selleck Chemicals (Houston, TX). Erlotinib e gefitinib sono stati disciolti in DMSO, aliquotati e conservati a -20°C.

Analisi di brevi ripetizioni in tandem

Per confermare l'autenticità della linea cellulare, è stata eseguita un'analisi di brevi ripetizioni in tandem (STR) utilizzando il sistema Cell ID™ (cat. G9500, Promega, Madison, USA) come descritto dal produttore. In breve, dieci loci specifici del genoma umano sono



stati amplificati mediante PCR e analizzati mediante elettroforesi capillare. Abbiamo scoperto che ER10, ER20 ed ER30 avevano le stesse dimensioni alleliche in tutti e dieci i loci come il clone parentale HCC827. Abbiamo anche trovato che le dimensioni alleliche dei loci sono identiche a quelle pubblicato da ATCC.

Purificazione del DNA e test di mutazione EGFR/KRAS

Il DNA è stato estratto dalle cellule usando il “QIAamp DNA mini kit” (Qiagen, Hilden, Germania), e lo stato di mutazione di EGFR e KRAS è stato esaminato usando il kit TheraScreen EGFR RGQ PCR e i TheraScreen KRAS RGQ PCR kit (Qiagen, Hilden, Germania) come descritto dal produttore.

Saggio di citotossicità *in vitro* per testare la sensibilità della linea cellulare a erlotinib o AXL-ADC

2000 cellule/pozzetto (5000 cellule nel caso di ER20) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e lasciate ad aderire per 6-8 ore prima di aggiungere erlotinib, gefitinib, afatinib, IgG1-AXL-107-vcMMAE o il controllo isotipico ADC IgG1-b12-vcMMAE; poi sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ per 5 giorni e quantificate mediante saggio Cell Titer Glo (come descritto nell'Esempio 8). Le cellule non trattate sono state utilizzate come riferimento per la crescita cellulare al 100%. Le piastre sono state incubate per 4 o 5 giorni a 37°C, 5% CO₂. Il saggio con “crystal violet” è stato eseguito aggiungendo una soluzione colorante per 5 minuti a temperatura ambiente, lavando le cellule due volte in H₂O, dissolvendo nuovamente in tampone citrato-Na (29,41 g di citrato-Na in 50% di EtOH) e misurando l'assorbanza a 570 nm.



Generazione di linee cellulari NSCLC resistenti a erlotinib o gefitinib

Tre linee cellulari isogeniche resistenti a erlotinib sono state generate dalla linea cellulare HCC827, mediante esposizione continua a erlotinib. Le cellule sono state inizialmente esposte a 1 μ M di erlotinib e la concentrazione di erlotinib è stata gradualmente aumentata a 20 μ M o 30 μ M, rispettivamente, per un periodo di sei mesi. Una volta che le linee cellulari hanno acquisito la resistenza a erlotinib, sono state coltivate in mezzo di coltura come sopra descritto, integrato con erlotinib 20 μ M o 30 μ M.

Allo stesso modo, una linea cellulare isogenica resistente a erlotinib e 5 linee cellulari resistenti a gefitinib sono state generate dalla linea cellulare PC9, mediante esposizione continua a erlotinib o gefitinib. Le cellule sono state inizialmente esposte a 1 μ M di erlotinib o gefitinib, e la concentrazione di TKI è stata gradualmente aumentata fino a 30 μ M nel corso di sei mesi.

Western blotting

L'espressione di Axl è stata determinata mediante analisi Western blot. L'attivazione di Axl è stata determinata misurando la fosforilazione usando anticorpi fosfo-specifici. Le cellule sono state lavate in TBS ghiacciato, centrifugate e lisate in tampone RIPA (10 mM Tris HCl pH 8,5 mM Na₂EDTA pH 8, 1% NP-40, 0,5% diossicolato di sodio, 0,1% SDS), contenente entrambi gli inibitori della proteasi e della fosfatasi (Complete Mini PhosphoSTOP, Roche, Basilea, Svizzera). Le concentrazioni proteiche sono state determinate mediante "Perce BCA



Protein Assay” (Thermo Fisher Scientific, USA) secondo il protocollo del produttore. 5-40 µg di proteina sono stati risolti su gel RunBlue SDS-PAGE 4-12% (Expedeon, San Diego, CA), trasferiti su membrana PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Danimarca), bloccati e quindi incubati
5 con anticorpi primari O/N a 4°C. L'anticorpo anti-actina è stato acquistato da Abcam (n. Cat. Ab8226) e l'anticorpo contro AXL totale è stato acquistato da R&S Systems (n. cat. AF154). Successivamente, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari di capra anti-coniglio, di capra anti-murino (Dako, Danimarca) o di asino anti-capra
10 (Santa Cruz) coniugati con HRP in diluizione 1:5000 per 1 ora a temperatura ambiente. Le bande immunoreattive sono state visualizzate mediante “Amersham ECL Prime Western Blotting Detecting Reagent” (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Regno Unito) ed esposte al film CL-Xposure (Thermo Fisher Scientific, USA).

15 Risultati

La linea cellulare selvatica (“wild-type”) HCC827 era altamente sensibile al trattamento con erlotinib, con un IC₅₀ di circa 0,005 µM. Le linee cellulari resistenti a erlotinib ER10, ER20 ed ER30, che sono state generate mediante esposizione a concentrazioni crescenti di erlotinib
20 per sei mesi, non erano sensibili a erlotinib (IC₅₀ > 50 µM) (**Tabella 18**). La stabilità del fenotipo resistente a erlotinib è stato confermato coltivando le linee cellulari ER10, ER20 ed ER30 in assenza di erlotinib per sei settimane. Dopo le sei settimane, le linee cellulari hanno mostrato lo stesso livello di resistenza a erlotinib. Lo stato mutazionale
25 di EGFR e KRAS delle linee cellulari resistenti a erlotinib è rimasto



invariato rispetto alla linea cellulare parentale (**Tabella 18**). L'espressione della proteina Axl è stato sovraregolata nelle linee cellulari derivate da HCC827 che avevano acquisito resistenza a erlotinib (**Figura 26A**). La sovraregolazione di Axl è stata preservata quando le linee cellulari sono state coltivate in assenza di erlotinib (**Figura 26A**).

Allo stesso modo, l'espressione della proteina Axl era sovraregolata nelle linee cellulari derivate da PC9 che avevano acquisito resistenza a erlotinib o gefitinib (**Figura 26B**).

Tabella 18. Caratteristiche della linea cellulare parentale

10 *HCC827 e delle linee cellulari derivate resistenti a erlotinib.*

	HCC827-wt	HCC827-ER10	HCC827-ER20	HCC827-ER30
Sensibilità a erlotinib	Sensibile	Resistente	Resistente	Resistente
IC ₅₀	0,005 µM	>50 µM	>50 µM	>50 µM
Esposte a conc. di erlotinib	0 µM	10 µM	20 µM	30 µM
Stato di EGFR	Exon19del	Exon19del	Exon19del	Exon19del
Stato di KRAS	wt	Wt	wt	Wt

È stata valutata la sensibilità delle cellule HCC827 e PC9 selvatiche e resistenti a erlotinib/gefitinib per IgG1-AXL-107-vcMMAE. Pertanto, le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di IgG1-AXL-107-vcMMAE (intervallo 10 µg/mL - 3,8 x 10⁻⁵ µg/mL) per 5 giorni dopo i quali è stata determinata la vitalità cellulare. Le **Figure 27A e B** mostrano che le cellule HCC827 e PC9 selvatiche non sono sensibili al trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27F e J**), ma mostrano una forte ridotta vitalità al trattamento con inibitori dell'EGFR (**Figura 27C e I**). Le linee cellulari HCC827-ER20 e HCC827-ER30, con resistenza acquisita a erlotinib EGFR-TKI, erano anche resistenti a EGFR-TKIs gefitinib e afatinib (**Figura 27D ed E**) ma

avevano mostrato una ridotta vitalità dopo il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27A**). La linea cellulare PC9- ER, con resistenza acquisita a erlotinib EGFR-TKI (**Figura 27I**) ha mostrato anche ridotta vitalità dopo trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 27B e K**).

5 Il trattamento con il controllo ADC, IgG1-b12-vcMMAE, non ha influito sulla vitalità cellulare fino a concentrazioni di 10 µg/mL in una qualsiasi delle linee cellulari testate (**Figura 27F, G, H, J e K**).

Esempio 23 - La resistenza all'inibitore PLX4720 di BRAF è associata con l'espressione sovraregolata della proteina Axl e con la
10 *sensibilità potenziata a IgG1-AXL-107-vcMMAE*

In un pannello di linee cellulari stabilite di melanoma umano (CDX) e linee cellulari con un numero basso di passaggi ("low passage") di melanoma derivate da paziente (PDX), sono state valutate l'espressione della proteina Axl e la sensibilità a IgG1-AXL-107-vcMMAE
15 in relazione alla loro resistenza intrinseca o acquisita all'inibizione della crescita mediante trattamento con l'inibitore PLX4720 di BRAF, un analogo all'inibitore vemurafenib clinicamente approvato di BRAF.

Coltura cellulare

SKMEL147 è stato ottenuto dal laboratorio di Reuven Agami
20 presso il Netherlands Cancer Institute. A875 è stato ottenuto da Thermo Fischer, le cellule COLO679 da Sigma, SKMEL28 e A375 da ATCC. Le linee cellulari di melanoma sono state poste in coltura in DMEM integrato con siero bovino fetale al 10% (Sigma), 100 U/ml di penicillina e 0,1 mg/ml di streptomina (tutto Gibco). Le linee cellulari sono state
25 mantenute a 37°C in un incubatore con umidificazione a CO₂ al 5%



(vol/vol).

Generazione di linee cellulari resistenti a PLX4720

Le linee cellulari sensibili dell'inibitore di BRAF (SKMEL28 e A375) sono state coltivate in presenza di concentrazioni crescenti dell'inibitore di BRAF PLX4720 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA, Azienda: Selleck Chemicals, Houston, TX, USA, numero di catalogo: S1152,) fino a 3 μ M per stabilire il corrispondente SKMEL28R resistente a PLX4720, e A375R. Tutte le linee cellulari resistenti ai farmaci sono state coltivate in modo permanente in presenza di 3 μ M di PLX4720.

10 Generazione di linee cellulari di melanoma con un numero basso di passaggi derivate dal paziente (PDX)

Il "Medical Ethical Board" dell'ospedale Antoni van Leeuwenhoek, Cancer Institute dei Paesi Bassi ha approvato la raccolta e l'uso del tessuto umano. Gli esperimenti sugli animali sono stati approvati dal comitato sperimentale sugli animali dell'istituto ed eseguiti secondo le norme e i regolamenti applicabili. Il materiale tumorale umano è stato ottenuto mediante un intervento chirurgico o prendendo biopsie tumorali da pazienti con melanoma maligno usando un ago di diametro 14. Frammenti tumorali di ~ 5mm³ sono stati usati per l'impianto sottocutaneo nei topi NOD.Cg-Prkdc^{Scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, che è stato eseguito sotto anestesia. La crescita tumorale è stata misurata due volte alla settimana con un calibro. Prima di raggiungere una dimensione del tumore di 1000 mm³, i topi sono stati sacrificati, i tumori sono stati rimossi e i pezzi di tumore sono stati dissociati in sospensioni di singole cellule, piastrati su piatti da 10 cm e coltivati



come colture cellulari primarie in DMEM + 10% FBS (Sigma) + 100 U/ml di penicillina e 0,1 mg/ml di streptomina (tutto Gibco).

Analisi Western blot

L'espressione di Axl e MITF è stata determinata usando
5 l'analisi Western blot. Le proteine nel lisato cellulare sono state separate su un gel SDS-PAGE al 4-12% e trasferite su membrana PVDF che è stata successivamente colorata con anticorpo specifico per Axl (sc-1096 Santa Cruz) in BSA al 5% in PBS-Tween, o su una membrana di nitrocellulosa colorata con MITF (ab12039 Abcam) in latte secco senza
10 grassi al 5% in PBS-Tween. Per controllare il caricamento su gel, sono stati usati anticorpi contro vinculina o beta-actina.

Quantificazione dell'espressione di AXL sulla membrana plasmatica delle linee cellulari di melanoma

L'espressione di AXL sulla membrana plasmatica delle linee
15 cellulari tumorali umane è stata quantificata mediante immunofluorescenza indiretta usando l'analisi QIFIKIT (DAKO, Cat nr K0078). Axl è stato rilevato utilizzando l'anticorpo monoclonale murino ab89224 (Abcam, Cambridge, Regno Unito). Le cellule aderenti sono state tripsinizzate e passate attraverso un setaccio cellulare per ottenere
20 sospensioni di singole cellule. Le cellule sono state rese pellet mediante centrifugazione per 5 minuti a 1.200 rpm, lavate con PBS e risospese a una concentrazione di 1×10^6 cellule/mL. Le fasi successive sono state eseguite su ghiaccio. 100 μ L delle sospensioni a cella singola (100.000 cellule per pozzetto) sono stati seminati in piastre a fondo tondo a 96
25 pozzetti in polistirene (Greiner Bio-One, Cat nr 650101). Le cellule sono



state rese pellet mediante centrifugazione per 3 minuti a 300 \times g e risospese in 50 μ l di campione di anticorpo o di campione di controllo isotipico di IgG1 murino (numero di cat. QF2040741, numero di lotto MA1-10406, Pierce) ad una concentrazione di 10 μ g/mL. Dopo
5 un'incubazione di 30 minuti a 4°C, le cellule sono state rese pellet e risospese in 150 μ L di tampone FACS (PBS contenente 0,1% BSA). Le biglie di set-up e calibrazione sono state aggiunte alla piastra secondo le istruzioni del produttore. Le cellule e le biglie in parallelo sono state lavate altre due volte con 150 μ l di tampone FACS e risospese in 50 μ l di
10 IgG di capra anti-murino coniugato a FITC (1/50; DAKO, n. cat. K0078). L'anticorpo secondario è stato incubato per 30 minuti a 4°C al buio. Le cellule e le biglie sono state lavate due volte con 150 μ l di tampone FACS e risospese in 100 μ l di tampone FACS. L'immunofluorescenza è stata misurata su un "FACS Calibur" (BD
15 Biosciences) registrando 10.000 eventi all'interno del "gate" delle cellule vitali. L'intensità media di fluorescenza delle biglie di calibrazione è stata utilizzata per calcolare la curva di calibrazione utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Per ciascuna linea cellulare, la capacità di legare l'anticorpo (ABC), una
20 stima del numero di molecole di AXL espresse sulla membrana plasmatica, è stata calcolata usando l'intensità media di fluorescenza delle cellule colorate con anticorpo contro AXL, sulla base dell'equazione della curva di calibrazione (interpolazione di incognite dalla curva standard, usando GraphPad Software).

25 Citotossicità *in vitro*



Le cellule sono state coltivate quasi a confluenza, dopo di che le cellule sono state tripsinizzate, risospese nel mezzo di coltura e passate attraverso un setaccio cellulare (BD Falcon, n. cat. 352340) per ottenere sospensioni a cella singola. Le cellule sono state piastrate in un formato da 96 pozzetti usando le seguenti densità di semina: 2000
5 cellule/pozzetto per linee cellulari stabilite, 4000 cellule/pozzetto per linee cellulari derivate da PDX. IgG1-AXL-107-vcMMAE è stato aggiunto 4 ore dopo la semina. Diluizioni seriali (10 volte; concentrazioni finali che variano tra 0,0001 e 10 µg/mL) di IgG1-AXL-107-vcMMAE sono state preparate in mezzo di coltura e aggiunte alle piastre. Dopo 5 giorni
10 (per campioni CD) o 8 giorni (campioni PDX) di incubazione a 37°C, 5% CO₂, è stato aggiunto il reagente CellTiter-Glo (Promega; Cat.No. G7571) ai pozzetti ed è stato eseguito il saggio “Luminescent Cell Viability Assay” (Promega, Madison, WI) secondo il protocollo del produttore. La
15 luminescenza è stata misurata dal lettore di micropiastre Infinite M200 (Tecan) e la vitalità è stata calcolata come segue: % vitalità = (luminescenza campione di interesse - luminescenza PAO) / (luminescenza media del veicolo di controllo trattato - luminescenza PAO), con PAO che rappresenta 5 µM di ossido di difenil arsina per
20 l’uccisione cellulare del 100%.

Modello di xenotrapianto di melanoma SKMEL147

L’attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata valutata nel modello SKMEL147 sottocutaneo di melanoma in topi nudi NMRI. I topi sono stati iniettati per via sottocutanea nel fianco sinistro
25 con 2,5x10⁵ cellule di melanoma SKMEL147, che esprimono alti livelli



di Axl (si veda Figura 28 e Tabella 15), che sono state risospese 1:1 in matrigel in un volume totale di 100 μ l. I tumori sono stati misurati tre volte alla settimana con un calibro e quando i tumori erano di 100 mm^3 gli animali sono stati randomizzati nei seguenti gruppi di trattamento:

5 IgG1-b12 (4 mg/kg), IgG1-b12-vcMMAE (4 mg/kg), IgG1-107 (4 mg/kg), IgG1-107-vcMMAE (2 mg/kg) e IgG1-107-vcMMAE (4 mg/kg).

Il giorno 12 e il giorno 19 dopo l'iniezione di cellule tumorali (giorno 1 e giorno 8 di randomizzazione) i composti del test sono stati iniettati nella vena della coda degli animali in un volume totale di 100 μ L. Gli animali sono stati sacrificati quando le dimensioni del tumore avevano superato 1000 mm^3 .

Trattamento di una popolazione mista di cellule selvatiche SKMEL28 e cellule SKMEL28 resistenti a PLX4720

Le cellule selvatiche SKMEL28 e le cellule SKMEL28 resistenti a PLX4720 (SKMEL28-R) sono state trasfettate con vettori d'espressione dei fluorofori mCherry (rosso) o GFP (verde), rispettivamente. Successivamente, le cellule sono state seminate in un rapporto 1:1, con 50.000 cellule di ciascuna linea cellulare in una piastra da 6 pozzetti (in totale 100.000 cellule/pozzetto). Dopo 3 ore, i seguenti composti sono stati aggiunti ai pozzetti: IgG1-AXL-107-vcMMAE (1 μ g/mL), IgG1-b12-MMAE (1 μ g/mL; controllo isotipico ADC), PLX4720 (10 μ M; inibitore di BRAF), dabrafenib (1 μ M; inibitore di BRAF) o trametinib (0,1 μ M; inibitore di MEK). Dopo 4 giorni, le cellule sono state tripsinizzate, lavate una volta in PBS + 1% BSA e analizzate mediante citometria a

15
20
25

flusso.



Immunoistochimica

L'espressione di AXL è stata valutata in tessuti interi (WT) con melanoma maligno incorporati con paraffina da appena tagliati e fissati con formalina (FFPE). La colorazione è stata eseguita manualmente in
5 “Sequenza Slide Rack” (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA; cat. no. 36105).

Prima della colorazione, i vetrini di tessuto FFPE sono stati deparaffinati in xilene al 100% (Sigma-Aldrich, n. Cat. 16446; tre volte, 5 min.) e disidratati in etanolo al 96% (Sigma Aldrich, n. 32294; due
10 volte, 5 min.) a RT. Successivamente, è stato eseguito il recupero dell'antigene. I vetrini IHC sono stati incubati in tampone citrato (pH6; DAKO; n. cat. S2369) per 5 minuti e bloccati per perossidasi endogena in tampone citrato/fosfato (acido citrico 0,43 M, Na₂HPO₄·2H₂O 0,35 M; pH 5,8) a RT per 15 min. I vetrini sono stati incubati in siero umano
15 normale al 10% (CLB/Sanquin, n. cat. K1146) in PBS, prima dell'incubazione con gli anticorpi primari. L'espressione di Axl è stata determinata mediante incubazione con 3 µg/mL di anticorpo H-124 contro Axl policlonale antiumano di coniglio in PBS integrato con siero umano normale al 2% a RT per 60 min. I vetrini sono stati lavati in PBS
20 integrato con 0,1% di Tween-20 (due volte, 3 minuti) e il legame degli anticorpi di coniglio specifici per Axl è stato rilevato con IgG anti-coniglio-poli-HRP “Bright Vision” non diluito. La HRP è stata visualizzata con cromoforo 3-ammino-9-etilcarbazolo (AEC) (colore rosso; Sigma, cat. no. A6926-100TAB); i nuclei sono stati colorati
25 con ematossilina (DAKO, cat. n. S3309). I vetrini sono stati analizzati da

un patologo certificato presso il Netherlands Cancer Institute (NKI, Amsterdam, Paesi Bassi), che ha segnato l'intensità e la localizzazione della colorazione di Axl in ciascun campione. Esempi sono mostrati nella Figura 39.

5 Risultati

L'espressione di AXL è stata valutata in un pannello di linee cellulari stabilite di melanoma (**Tabella 19**) e in linee di melanoma primario con un numero basso di passaggi (PDX, **Tabella 20**). L'espressione AXL, determinata mediante western blot (**Figura 28**), era
10 inversamente correlata con l'espressione di MITF in linee cellulari stabilite (**Figura 28A**) nonché in campioni derivati da paziente clinico (**Figura 28B**). Nel pannello delle linee cellulari stabilite, l'espressione di Axl è stata anche determinata mediante citometria a flusso quantitativa. Un esempio di linea cellulare una negativa e positiva di AXL è mostrata
15 in **Figura 29**. I livelli di espressione di Axl (espressi come ABC) per tutte le linee cellulari sono elencate in **Tabella 19**, insieme allo stato di mutazione di BRAF delle linee cellulari.

Successivamente, è stata valutata la sensibilità delle linee cellulari stabilite di melanoma e del pannello PDX a IgG1-AXL-107-vcMMAE in saggi di vitalità. Le cellule sono state esposte a
20 concentrazioni crescenti di IgG1-AXL-107-vcMMAE (intervallo da 1×10^{-4} a $10 \mu\text{g/mL}$) per 5 giorni dopo i quali è stata determinata la vitalità cellulare. I risultati sono riassunti in **Tabella 19 e 20**, le curve dose-risposta sono mostrate in **Figura 30 e 31**. La **Figura 30** mostra che
25 tutte e 4 le linee cellulari che esprimono AXL (SKMEL147, A875, A375R,



SKMEL28R), tre dei quali erano resistenti a PLX4720, sono sensibili al trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Le due linee cellulari negative a AXL, COLO679 e SKMEL28, non hanno mostrato cambiamenti nella vitalità dopo il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Tre campioni PDX resistenti a PLX4720 sono stati testati in saggi di vitalità con IgG1-AXL-107-vcMMAE. La **Figura 31** mostra che le due colture PDX ad alta espressione di AXL, MO16 e MO19R, erano sensibili al trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE, mentre la cultura M082 PDX a bassa espressione di AXL non ha mostrato una diversa risposta da quella osservata con il trattamento del controllo IgG1-b12-vcMMAE.

Tabella 19. Caratteristiche del pannello di linee cellulari di melanoma

Linea cellulare	Espressione di AXL (western blot)	Espressione di AXL (FACS) numero recettore (ABC)	BRAF	NRAS	Sensibilità PLX4720	Sensibilità HuMax-AXL-ADC
SKMEL147	+	34981	wt	Q61R	resistente	sensibile
A875	+	37079	V600E	selvatico	sensibile	sensibile
COLO679	-	BLQ	V600E	Wt	Non testato	Resistente
A375R	+	14228	V600E	Wt	resistente	sensibile
SKMEL28	-	BLQ	V600E	Wt	sensibile	Resistente
SKMEL28R	+	63809	V600E	Wt	resistente	sensibile

* BLQ = Sotto il limite di quantificazione (<3300, il più basso valore di ABC delle biglie di calibrazione)

Tabella 20. Caratteristiche delle colture di melanoma derivate da paziente

Nome	Stato BRAF/NRAS	espressione di AXL (western Blot)	espressione di AXL numero recettore (ABC, FACS)	sensibilità LX4720	sensibilità HuMax-AXL-ADC
M016	NRAS ^{Q61R}	+	13688	resistente	sensibile
M019R	BRAF ^{V600E}	++	25988	resistente	sensibile
M082	BRAF ^{V600E}	(bassa)	3376	resistente	Insensibile

Nel modello di xenotrapianto di melanoma SKMEL147, i topi trattati con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE o IgG1-AXL-107 non hanno
 5 mostrato inibizione della crescita tumorale. IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto l'inibizione della crescita tumorale a 2 mg/kg, e a una dose di 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una forte regressione del tumore, che è durata fino al giorno 50 circa (**Figura 36A**).

HuMax-AXL-ADC alla dose di 4 mg/kg ha quindi mostrato un
 10 profondo effetto antitumorale, ma i tumori hanno iniziato a crescere di nuovo dopo il giorno 50. Quattro topi che hanno mostrato ricrescita del tumore alla regressione iniziale del tumore con 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE sono stati ri-trattati con una singola dose di 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE nei giorni 55, mentre per confronto sono stati
 15 osservati altri due topi.

Il ri-trattamento con 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE ha comportato una regressione del tumore in tutti e quattro i topi, mentre i 2 topi che sono stati osservati hanno mostrato una crescita tumorale (**Figura 36B**). Due dei quattro topi ri-trattati hanno mostrato

regressione del tumore che è rimasta almeno fino al giorno 80, mentre la ricrescita del tumore è stata osservata intorno al giorno 70 negli altri due topi ri-trattati (**Figura 36B**).

Nella popolazione mista di cellule SKMEL28 selvatiche e
5 cellule SKMEL28 resistenti a PLX4720, rispetto alle cellule non trattate di controllo, i numeri totali di cellule sono stati ridotti del 74-62% quando le miscele cellulari sono state trattate con IgG1-AXL-107-vcMMAE, PLX4720, o dabrafenib (**Figura 37A**). Il trattamento delle
10 miscele cellulari con le combinazioni di IgG1-AXL-107-vcMMAE e PLX4720, IgG1-AXL-107-vcMMAE e dabrafenib, dabrafenib e trametinib, o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una riduzione dell'81-92% dei numeri totali di cellule rispetto alle cellule non trattate (**Figura 37A**).

Per valutare se specifiche popolazioni cellulari sono state
15 sradicate, è stato determinato il rapporto tra verde (cellule SKMEL28-R positive a GFP) e rosso (cellule SKMEL28 positive per mCherry). Come previsto, il trattamento delle non trattate e di IgG1-b12-vcMMAE non ha influenzato il rapporto GFP/mCherry, poiché anche il numero totale di
20 cellule non è stato influenzato (**Figura 37B**). Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE ha determinato un rapporto GFP/mCherry fortemente ridotto (**Figura 37B**), indicando l'uccisione specifica di cellule SKMEL28-R.

Al contrario, il trattamento con inibitori di BRAF PLX4720 o
dabrafenib ha aumentato il rapporto GFP/mCherry (**Figura 37B**),
25 indicando l'uccisione specifica di cellule SKMEL28. Le combinazioni di



IgG1-AXL-107-vcMMAE e PLX4720, dabrafenib e trametinib, o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE hanno mostrato rapporti più vicini a 1 (**Figura 37B**), indicando che entrambi i tipi di cellule sono stati uccisi con efficacia simile. Il trattamento con la
 5 combinazione di IgG1-AXL-107-vcMMAE e dabrafenib ha determinato un rapporto GFP/mCherry fortemente ridotto (**Figura 37B**), indicando un'uccisione più efficiente delle cellule SKMEL28-R alle concentrazioni utilizzate.

Risultati IHC

10 In totale sono stati analizzati 45 campioni, di cui 3 non contenevano alcun materiale tumorale e sono stati pertanto esclusi dall'analisi. Inoltre, sono stati inclusi 7 campioni pre e post vemurafenib corrispondenti ("matched") degli stessi pazienti, e 1 campione corrispondente pre e post dabrafenib / trametinib.

15 In 41/42 campioni l'espressione di Axl è stata rilevata in sottoinsiemi della regione del melanoma. L'intensità della colorazione differiva per tumore del paziente (Tabella 21).

Inoltre, l'aumento della regolazione dell'espressione di Axl (misurata dall'aumento dell'intensità della colorazione da parte del
 20 patologo) è stato osservato in 4/7 campioni pre e post vemurafenib corrispondenti (Tabella 21).

Tabella 21. Colorazione per Axl in tessuti tumorali da pazienti con melanoma

Caso nr.	Trattamento	Pre-/post-trattamento	campione corrispondente	Colorazione per Axl in cellule tumorali ^a	Commenti
1	vemurafenib	post	NA	Parzialmente +	
2	vemurafenib	post	17	Debolmente + a +	
3	dabr/tram	post	NA	++ a +++	

GEN014ESM

4	vemurafenib	post	NA	Focalmente +	
5	vemurafenib	post	NA	Parzialmente debolmente +	
6	dabr/tram	post	40	NA	Molto necrotico
7	dabr/tram	pre	16	Sporadico +	
8	vemurafenib	post	38	Sporadico +	le cellule debolmente positive ai margini del tumore potrebbero essere il risultato della colorazione del manufatto
9	vemurafenib	post	NA	-	
10	vemurafenib	post	NA	Parzialmente debolmente +	
11	vemurafenib	post	NA	Debolmente +	molti melanofagi +
12	vemurafenib	post	NA	Localmente debolmente +	alcuni melanofagi +
13	vemurafenib	post	NA	++ a +++	
14	vemurafenib	post	39	Debolmente +	molti melanofagi +
15	vemurafenib	post	24	Debolmente +	
16	dabr/tram	post	7	Debolmente +	
17	vemurafenib	pre	2	Parzialmente +	
18	vemurafenib	18 stabili post malattia	NA	Debolmente +	
19	vemurafenib	post	NA	Localmente + a ++	
20	vemurafenib	20 stabili post malattia	NA	Debolmente +	
21	vemurafenib	post	NA	Debolmente +	
22	vemurafenib	post	NA	Parzialmente +	molti melanofagi +
23	vemurafenib	post	NA	+ a ++	
24	vemurafenib	pre	15	Sporadico +	
25	vemurafenib	post	NA	Sporadico +	
26	vemurafenib	pre	44	Debolmente +	molti melanofagi +
27	vemurafenib	post	NA	Parzialmente e debolmente +	
28	vemurafenib	28 stabili post malattia	NA	Debolmente +	Sono presenti quantità limitate di cellule tumorali
29	vemurafenib	post	NA	Parzialmente e Debolmente +	
30	vemurafenib	post	NA	Parzialmente +	
31	vemurafenib	post	NA	Parzialmente +	
32	vemurafenib	post	NA	+	Piccola quantità di cellule

GEN014ESM

					tumorali / melanofagi con melanina
33	vemurafenib	post	NA	Localmente debolmente +	
34	vemurafenib	post	NA	Debolmente + a +	
35	vemurafenib	post	NA	Debolmente +	
36	vemurafenib	post	NA	Debolmente +	molti melanofagi +
37	vemurafenib	post	NA	Parzialmente debolmente +	
38	vemurafenib	pre	8	Debolmente + a +	
39	vemurafenib	pre	14	+	Le cellule positive sono presenti nei seni dei linfonodi. Non è certo se esse sono cellule tumorali o macrofagi poiché queste cellule contengono un citoplasma piuttosto ricco
40	dabr/tram	pre	6	NA	non si riscontrano lesioni neoplastiche
41	vemurafenib	post	NA	NA	non si riscontrano lesioni neoplastiche
42	vemurafenib	post	NA	Parzialmente +	aree negative parziali potrebbero essere dovute alla colorazione del manufatto
43	vemurafenib	post	NA	Debolmente + a +	
44	vemurafenib	post	26	+ a ++	
45	vemurafenib	post	NA	Parzialmente debolmente +	

a-: negativo; intensità di colorazione positiva: debolmente + <+ <++ <+++; area di colorazione positiva: sporadica < focale < locale <parziale; NA: non disponibile

Esempio 24 - modello PDX CV1664

5

L'attività antitumorale di IgG1-AXL-107-vcMMAE è stata

valutata nel modello CV1664 sottocutaneo di PDX di carcinoma cervicale in topi nudi BALB/c (esperimenti condotti da CrownBioscience, Changping District, Pechino, Cina). L'inoculazione di frammenti di tumore in topi nudi BALB/c e la randomizzazione sono state eseguite come descritto nell'Esempio 21.

Il trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (2 o 4 mg/kg) è stato eseguito al giorno 0 e 7 dopo la randomizzazione dei gruppi (**Figura 38**). Il trattamento negli stessi giorni con paclitaxel (20 mg/kg; per via intraperitoneale), IgG1-AXL-107 non coniugato (4 mg/kg), IgG1-b12-vcMMAE (4 mg/kg) e IgG1-b12 (4 mg/kg) sono stati usati come controlli.

IgG1-AXL-107-vcMMAE ha indotto una forte regressione del tumore a entrambi i livelli di dosaggio, che è durata almeno fino al giorno 49 (**Figura 38A, B**). Il trattamento con IgG1-AXL-107 e IgG1-b12-vcMMAE non coniugato ha indotto solo una lieve inibizione della crescita tumorale rispetto al gruppo di controllo IgG1-b12. Paclitaxel ha indotto una regressione parziale del tumore.

I due topi che hanno mostrato una ricrescita tumorale dopo la regressione iniziale del tumore con 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE sono stati ri-trattati con 2 dosi di 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE nei giorni 55 e 62. Ciò ha provocato una regressione parziale del tumore in entrambi i topi (**Figura 38C**). Dopo la ricrescita dei tumori, questi topi sono stati ri-trattati con 2 dosi di 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE nei giorni 105 e 112, che di nuovo ha provocato una regressione parziale del tumore in entrambi gli animali (**Figura 38C**).



I tre topi che hanno mostrato una ricrescita tumorale dopo una regressione tumorale iniziale con paclitaxel sono stati ri-trattati con 2 dosi di 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE nei giorni 55 e 62. Due dei tre topi hanno mostrato una completa regressione del tumore dopo il ri-
5 trattamento con IgG1-AXL-107-vcMMAE (**Figura 38D**). L'altro topo ha mostrato una regressione parziale del tumore. Dopo la ricrescita del tumore, questo topo è stato ri-trattato con 2 dosi di 4 mg/kg di IgG1-AXL-107-vcMMAE nei giorni 98 e 105, che di nuovo ha provocato una regressione parziale del tumore (**Figura 38D**).

10 **LISTA DI REFERENZE**

- Bahadoran et al., J Clin Oncol; 2013 Jul 1; 31(19): e324-e326
Bansal et al., Oncotarget. 2015 Jun 20;6(17):15321-31
Blakely et al., Cancer Discov. 2012 Oct;2(10):872-5
Bleeker et al., J Immunol. 2004 Oct 1;173(7):4699-707.
15 Bollag et al., Nat Rev Drug Discov 2012 Nov;11(11):873-86
Brand et al., Clin Cancer Res. 2015 Jun 1;21(11):2601-12
Dahlman et al., Cancer Discov. 2012 Sep;2(9):791-7. Epub
2012 Jul 13.
Debruyne et al., Oncogene. 2015 Nov 30. doi:
20 10.1038/onc.2015.434
Dufies et al., Oncotarget. 2011 Nov;2(11):874-85
Elkabets et al., Cancer Cell. 2015 Apr 13;27(4):533-46
Greig et al., Drugs, 2016 Feb;76(2):263-73.
Herbst et al., Expert Opin Investig Drugs. 2007 Feb;16(2):239-
25 49



- Hilger et al., Int J Clin Pharmacol Ther. 2002 Dec;40(12):567-8.
- Hong et al., Cancer Lett. 2008 Sep 18;268(2):314-24.
- Hong et al., Cancer Res. 2013 Jan 1;73(1):331-40.
- 5 Hong et al., Clin Cancer Res. 2012 Apr 15;18(8):2326-35.
- Huang et al., Cancer Res. 2010 Sep 15;70(18):7221-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0391
- Kim et al., Curr Opin Mol Ther. 2004 Feb;6(1):96-103.
- Kim et al., Mol Oncol. 2013 Dec;7(6):1093-102.
- 10 Konieczkowski et al., 2014, Cancer Discov 4: 816-827.
- Li et al., Oncogene. 2008 Aug 7;27(34):4702-11.
- Li et al., Cancer Lett. 2016 Jan 28;370(2):332-44.
- Liu et al., Cancer Res. 2009 Sep 1;69(17):6871-8
- Mahadevan et al., Oncotarget. 2015 Feb 10;6(4):1954-66
- 15 Mordant et al., Mol Cancer Ther. 2010 Feb;9(2):358-68
- Müller et al., Nat Commun. 2014 Dec 15;5:5712
- Park et al., Leukemia. 2015 Dec;29(12):2382-9
- Pettazoni et al., Cancer Research 2015;75: 1091-1101.
- Pollack et al., J Pharmacol Exp Ther. 1999 Nov;291(2):739-48
- 20 Prewett et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 Nov;19(6):419-27.
- Sirotnak et al., Clin Cancer Res. 2000 Dec;6(12):4885-92.
- Talavera et al., Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5851-9
- Tan et al., Lung Cancer. 2012 May;76(2):177-82.
- 25 Wilson et al., Cancer Res. 2014 Oct 15;74(20):5878-90



- Wong et al., J Pharmacol Exp Ther. 2009 Apr;329(1):360-7.
Xia et al., Oncogene. 2002 Sep 12;21(41):6255-63.
Yang et al., Crit Rev Oncol Hematol. 2001 Apr;38(1):17-23.
Zhang et al., Nat Genet. 2012 Jul 1;44(8):852-60
5 Zhou et al., Oncogene. 2016 May;35(21):2687-97
WO 2014/174111; Pierre Fabré Medicament and Spirogen
Sarl
WO 09/062690; U3 Pharma
WO 2010/130751; U3 Pharma
10 WO 2014/093707; Università di Stanford
EP 2 228 392 A1; Chugai
Yang et al., EORTC meeting 2013, Poster 493 (2013a)
Yang et al., Int. J. Cancer: 132, E74-E84 (2013b)
Paccez et al., Int. J. Cancer: 134, 1024-1033 (2014) (Epub
15 2013 Jun 4)
Leconet et al., Oncogene, 1-10 (2013)
Linger et al., Expert Opin. Ther. Targets, 14(10):1073-1090
(2010)
Li et al., Oncogene, 28, 3442-3455 (2009)
20 Ye et al., Oncogene, 1-11 (2010)
Alley et al., Current Opinion in Chem. Bio., 4, 529-537 (2010)
lida et al., Anticancer Research, 34:1821-1828 (2014)
Tschuch et al., AACR-EORTC meeting 2015, Poster A10 (2015)
King et al., Cancer Res. 2006 Dec 1;66(23):11100-5.
25 Montagut et al., J.Cancer Res. 2008 Jun 15;68(12):4853-61.



- Sequist et al., N Engl J Med. 2015 Aug 6;373(6):578-9
- Li et al., Structure. 2008 Feb;16(2):216-27
- Pedersen et al., Cancer Res. 2010 Jan 15;70(2):588-97.
- Mishima et al., Cancer Res. 2001 Jul 15;61(14):5349-54
- 5 WO 2012/175691; INSERM
- WO 2012/175692; INSERM
- WO 2013/064685; PF Medicament
- WO 2013/090776; INSERM
- WO 2009/063965; Chugai Pharmaceuticals
- 10 WO 2010/131733
- Hfizi et al. et al., 2006, FEBS Journal, 273; 5231-5244
- WO 2007/059782; Genmab A/S
- Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)
- Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90
- 15 Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24
- Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)
- Huston et a/., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)
- Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven
Press, N.Y. (1989)
- 20 Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27 et al., 209-212,
1999
- Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
- Korshunov et al, Clin Sci (Lond). 2012 Apr;122(8):361-8.
- Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New
25 York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,



Ch. 15

Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and

Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp
5 662,680,689 (1991)

WO 2004/010957; Seattle Genetics, Inc.

US 7,659,241; Seattle Genetics, Inc.

Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable
Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In:

10 Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)

WO 2011/131746; Genmab A/S

WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech

WO9850431; Genetech

WO2011117329; Roche

15 EP1870459; Amgen

WO2009089004; Amgen

US 2010/00155133; Chugai

WO 2010/129304; Oncomed

WO2007/110205; EMD Serono

20 WO 2010/015792; Regeneron

WO 11/143545; Pfizer/Rinat

WO 2012/058768: Zymeworks/Merck

WO 2011/028952; Xencor

WO 2009/080254; Roche

25 WO 2008/003116; F-Star



GEN014ESM

- US 7,262,028; Crucell/Merus
- US 7,612,181; Abbott
- WO 2010/0226923; Unilever, Sanofi Aventis
- US 7,951,918; Biogen Idec
- 5 CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
- WO 2012/025525; Roche
- WO 2012/025530; Roche
- WO 2008/157379; Macrogenics
- WO 2010/080538; Macrogenics
- 10 Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological
Basis Of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing
Co., 1990
- Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993)
- US 5,194,594
- 15 US 2005/0238649
- WO 2013/173391; Concertis Biosystems, Corp.
- Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy
655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott
Raven (1996))
- 20 US 4,681,581
- US 4,735,210
- US 5,101,827
- US 5,102,990
- US 5,648,471
- 25 US 5,697,902

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mylo Montch", is located in the bottom right corner of the page.

GEN014ESM

- US 4,766,106
- US 4,179,337
- US 4,495,285
- US 4,609,546
- 5 Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al.,
Biochemistry 13, 1014 (1974)
- Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)
- Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)
- Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu
- 10 Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)
- WO 2002/083180; Syngenta BV
- WO 2004/043493; Syngenta BV
- WO 2007/018431; Syngenta BV
- WO 2007/089149; Syngenta BV
- 15 WO 2009/017394; Syngenta BV
- WO 2010/62171; Syngenta BV
- US 6,989,452; Medarex
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th
Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
- 20 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.
Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)
- US 6,077, 835
- WO 00/70087
- 25 Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)



GEN014ESM

- WO 00/46147
- Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
- Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)
- Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)
- 5 US 5,589,466
- US 5,973,972
- Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
- Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology,
Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)
- 10 Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)
- Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994a)
- Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49
101 (1994b)
- Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65
15 93 (1995)
- Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546
(1995)
- Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992)
- Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993)
- 20 Tuaille et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)
- Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994)
- Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)
- US 5,545,806
- US 5,569,825
- 25 US 5,625,126



GEN014ESM

- US 5,633,425
- US 5,789,650
- US 5,877,397
- US 5,661,016
- 5 US 5,814,318
- US 5,874,299
- US 5,770,429
- US 5,545,807
- WO 98/024884
- 10 WO 94/025585
- WO 93/001227
- WO 92/022645
- WO 92/003918
- WO 01/009187
- 15 Shieh, Neoplasia 2005
- Koorstra, Cancer Biol Ther 2009
- Hector, Cancer Biol Ther 2010
- Sun, Ann Oncol 2003
- Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For
- 20 Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase
- "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's
Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-
652 (Mack Publishing Co., 1990)
- Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in
- 25 Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.)



GEN014ESM

- (Chapman & Hall 1993)
- US 5,057,313
- US 6,331,175
- US 5,635,483
- 5 US 5,780,588
- Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):
3580-3584
- US5663149
- Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother.
10 42:2961-2965
- Senter et al., Proceedings of the American Association for
Cancer Research. Volume 45, abstract number 623,
presented March 28, 2004
- US 2005/0238649
- 15 US 7,498,298; Seattle Genetics, Inc.
- US 7,994,135; Seattle Genetics, Inc.
- WO 2005/081711; Seattle Genetics, Inc.
- Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208
- EP 2 220 131; U3 Pharma
- 20 WO 2011/159980; Genentech
- Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23
- US 7,829,531; Seattle Genetics, Inc.
- US 7,851,437; Seattle Genetics, Inc.
- WO 2013/173392; Concortis Biosystems, Corp.
- 25 WO 2013/173393; Concortis Biosystems, Corp.



Sun et al. (2005) Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290

McDonagh et al., (2006) Protein Eng. Design Sel. 19: 299-307

Alley et al., (2008) Bioconjugate Chem. 19: 759-765

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mylo Moutch", is located in the bottom right corner of the page. The signature is written in a cursive style.

LISTA DI SEQUENZE

<110> Genmab A/S
 <120> CONIUGATI ANTICORPO-FARMACO SPECIFICI PER AXL PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO
 <130> P/0097-WO
 <160> 162
 5 <170> PatentIn, versione 3.5
 <210> 1
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ile Trp Ile Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 20 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 2
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

GENO14ESM

20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 5 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 10 <210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 15 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Ile Ser Gly Ala Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 4

GEN014ESM

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 5

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

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

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

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

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

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

GEN014ESM

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

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 7

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

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

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

5

10

15

20

25

GEN014ESM

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

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

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

5

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

Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

 <400> 8

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

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

15

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

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

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

20

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

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

Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT

25

GEN014ESM

<213> homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

15 <400> 10

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

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

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

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

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

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

GEN014ESM

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

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

5

<400> 11

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

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

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

10

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

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

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

15

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

<210> 12
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 12

20

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

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

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

25

Ser Asp Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

GEN014ESM

50 55 60

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

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

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

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

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 14

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

GEN014ESM

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

GEN014ESM

<210> 16
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 16

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

5

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

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

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

10

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

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

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

15

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 17

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

20

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

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

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

25

GEN014ESM

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

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

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

 5 Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 18

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

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

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

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

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

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

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

 <210> 19
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 19

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

GEN014ESM

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser His Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 5 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Thr Ile Ile Thr His Phe Asp Tyr
 100 105 110
 10 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 20
 15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 20 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

GEN014ESM

<210> 21
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 22

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

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

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

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

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

5

10

15

20

25

GEN014ESM

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 5 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 10 <400> 25
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 15 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 26
 <211> 107
 25

GEN014ESM

<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 26

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

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

5

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

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

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

10

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

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

<210> 27
<211> 124
<212> PRT
<213> homo sapiens

15

<400> 27

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

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

20

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

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

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

25

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

GEN014ESM

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

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

<210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29

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

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

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

5

10

15

20

25

GEN014ESM

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 5 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 10 <400> 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 15 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr
 85 90 95
 20 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 31
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 31
 25 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

GEN014ESM

	1			5					10				15				
		Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
				20						25				30			
		Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35					40					45			
5		Gly	Glu	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
			50					55					60				
		Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
		65					70					75				80	
		Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
						85					90					95	
		Arg	Phe	Ile	Thr	Met	Ile	Arg	Gly	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asp	Tyr
10					100					105					110		
		Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				115					120								
		<210>		32													
		<211>		123													
		<212>		PRT													
		<213>		homo sapiens													
		<400>		32													
15		Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
		1				5					10					15	
		Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
					20					25					30		
		Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35					40					45			
20		Gly	Glu	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
			50					55					60				
		Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
		65					70					75				80	
		Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
						85					90					95	
25		Arg	Phe	Ile	Thr	Leu	Ile	Arg	Gly	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asp	Tyr

GEN014ESM

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5 <400> 33

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 34

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

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

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

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

GEN014ESM

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

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

Ala Arg Gly Arg Lys Leu Gly Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35

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

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

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

15 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 36

25 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

GEN014ESM

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 37

Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr
1 5

5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 38

Ala Lys Ile Trp Ile Ala Phe Asp Ile
1 5

10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 39

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

15

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 40

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

20

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

25

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 42



GEN014ESM

Ile Ser Ile Ser Gly Ala Ser Thr
1 5

<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 43

5

Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 44

10

Gln Gly Ile Ser Asn Trp
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 45

15

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 46

20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 47

25

Ile Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens



GEN014ESM

<400> 48

Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 49

5

Gln Gly Ile Ser Asn Trp
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 50

10

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 51

15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 52

20

Ile Ser Ile Gly Gly Gly Asn Ala
1 5

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 53

Ala Lys Pro Gly Phe Ile Met Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 54



GEN014ESM

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

<400> 54

Ala Lys Pro Gly Phe Ile Leu Val Arg Gly Pro Leu Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 55

Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr
1 5

10

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

15

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

20

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 58

Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

25

<210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 59

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
1 5 10 15



GEN014ESM

Asp Ile

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 60

5

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 61

10

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 62

15

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 63

20

Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 64
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 64

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
1 5 10 15

25

Asp Ile



GEN014ESM

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 65

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 66

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
1 5

10

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 67

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

15

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 68

Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

20

<210> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 69

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
1 5 10 15

Asp Ile

25

<210> 70
<211> 7



GEN014ESM

<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 70

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 71

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
1 5

10

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 72

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

15

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 73

Ile Asn Gln Ser Gly
1 5

20

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 74

Ile Gln Gln Ser Gly Ser Thr
1 5

25

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 75

Ala Ser Gly Asn Trp Asp His Phe Phe Asp Tyr
1 5 10



GEN014ESM

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 76

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 77

Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

10

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 78

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr His
1 5

15

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 79

Ile Ser His Ser Gly Arg Thr
1 5

20

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 80

Ala Ser Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Thr Ile Ile Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

25

<210> 81
<211> 6
<212> PRT



GEN014ESM

<213> homo sapiens

<400> 81

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

5

<400> 82

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

10

<400> 83

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

15

<400> 84

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala
1 5

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 85

20

Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

25

<400> 86



GEN014ESM

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 87

5

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 88

10

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 89

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala
1 5

15

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 90

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

20

Ile

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 91

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

25



GEN014ESM

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 92

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 93

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

10

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 94

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val
1 5

15

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 95

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile

20

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 96

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

25

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens



GEN014ESM

<400> 97

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 98

5

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 99

10

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val
1 5

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 100

15

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 101

20

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 102

25

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Thr



GEN014ESM

1 5
<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 103
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

5

<210> 104
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 104
Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala
1 5

10

<210> 105
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 105
Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile Ser

15

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 106
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

20

<210> 107
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 107
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Tyr Thr
1 5

25

<210> 108

GEN014ESM

<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 108

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
1 5

5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 109

Ile Ser His Ser Gly Arg Thr
1 5

10

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 110

Ala Arg Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Ala Ile Ile Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

15

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 111

Ala Arg Phe Ile Thr Leu Ile Arg Gly Ala Ile Ile Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

20

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 112

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

25

<210> 113



GEN014ESM

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

<400> 113

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 114

Gly Phe Ser Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 115

Ile Ser Tyr Asp Gly Asp Asn Lys
1 5

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 116

Ala Arg Gly Arg Lys Leu Gly Ile Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 117

Gln Gly Ile Ser Ser Ala
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 118

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

5

10

15

20

25



GEN014ESM

<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (6) .. (6)
<223> In cui X è A o G

<400> 119

Ile Ser Ile Ser Gly Xaa Ser Thr
1 5

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> Misc
<222> (13) .. (13)
<223> In cui X è I o F

<400> 120

Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Phe Asp Xaa
1 5 10

<210> 121
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (8) .. (8)
<223> In cui X è I o F

<400> 121

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Xaa
1 5

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (2) .. (2)
<223> In cui X è S o R

GEN014ESM

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (10) .. (10)
<223> In cui X è T o A

<400> 122

Ala Xaa Phe Ile Thr Met Ile Arg Gly Xaa Ile Ile Thr His Phe Asp
1 5 10 15

5

Tyr

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

10

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (6) .. (6)
<223> In cui X è S o N

<400> 123

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Ala
1 5

15

<210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 124

Ile Ser Val Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

20

<210> 125
<211> 18
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 125

Ala Lys Glu Gly Tyr Ile Trp Phe Gly Glu Ser Leu Ser Tyr Ala Phe
1 5 10 15

Asp Ile

25

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens



GEN014ESM

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (8) .. (8)
<223> In cui X è A o V

<400> 126

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Xaa
1 5

5

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (5) .. (5)
<223> In cui X è D o N

<400> 127

10

Ala Arg Arg Gly Xaa Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Pro Asp Val Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

15

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (4) .. (4)
<223> In cui X è S o cancellato

<400> 128

Gln Ser Val Xaa Ser Ser Tyr
1 5

20

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> caratteristica_misc
<222> (3) .. (3)
<223> In cui X è R o Y

25

<220>



GEN014ESM

<221> caratteristica_misc
 <222> (4) . . (4)
 <223> In cui X è S o G

 <220>
 <221> caratteristica_misc
 <222> (4) . . (4)
 <223> In cui X è S o G

 <220>
 <221> caratteristica_misc
 <222> (5) . . (5)
 <223> In cui X è N o S

 <220>
 <221> caratteristica_misc
 <222> (6) . . (6)
 <223> In cui X è W o S

 <220>
 <221> caratteristica_misc
 <222> (6) . . (6)
 <223> In cui X è W o S

 <220>
 <221> caratteristica_misc
 <222> (7) . . (7)
 <223> In cui X è L o Y

 <400> 129

 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5

 <210> 130
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 130

 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15

 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
 20 25 30

 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45

 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60

 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80

 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp

GEN014ESM

					85					90					95				
	Ile	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr			
				100					105					110					
	Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser			
			115					120					125						
5	Gln	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu			
		130					135					140							
	Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys			
	145					150					155					160			
	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp			
					165					170					175				
10	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu			
				180					185					190					
	His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His			
			195					200					205						
	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu			
	210						215					220							
15	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					
20	Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser			
			275					280					285						
	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro			
		290					295					300							
	Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp			
	305					310					315					320			
25	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro			
					325					330					335				

GEN014ESM

5

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430

10

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480

15

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

20

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

25

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

GEN014ESM

5
 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

10
 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

15
 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

20
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830

25
 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
 835 840 845

GEN014ESM

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
 850 855 860
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
 865 870 875 880
 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 885 890
 <210> 131
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 131
 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
 35 40 45
 Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
 50 55 60
 Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
 85 90 95
 Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
 100 105 110
 Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met
 115 120 125
 Val His Leu Glu Gly Arg Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Phe Val Gly
 130 135 140
 Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Lys Ala Val
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro
 165 170 175

GEN014ESM

5
 10
 15
 20
 25

Glu Pro Val Thr Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Pro
 180 185 190

Val Thr Gly His Ser Ser Gln His Ser Leu Gln Thr Pro Gly Leu Asn
 195 200 205

Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr
 210 215 220

Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Arg Pro His His
 225 230 235 240

Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr
 245 250 255

Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Asn Leu Gln Ala
 260 265 270

Val Leu Ser Asp Asp Gly Val Gly Ile Trp Leu Gly Lys Ser Asp Pro
 275 280 285

Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser Val Pro Pro His Gln Leu
 290 295 300

Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp Thr His Trp Leu Pro Val
 325 330 335

Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Val Ser Ala
 340 345 350

Met Arg Asn Gly Ser Gln Val Leu Val Arg Trp Gln Glu Pro Arg Val
 355 360 365

Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Arg Gly Gln
 370 375 380

Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Thr Arg Glu Val Thr
 385 390 395 400

Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala Asn Leu Thr Val Ser Val
 405 410 415

Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro

GEN014ESM

420 425 430

Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln Pro Leu His His Leu Val
435 440 445

Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu
450 455 460

5 Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe
465 470 475 480

Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu
485 490 495

Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys
500 505 510

10 Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile
515 520 525

Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His
530 535 540

Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val
545 550 555 560

15 Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val
565 570 575

Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe
580 585 590

Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met
595 600 605

20 Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro
610 615 620

Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser
625 630 635 640

Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr
645 650 655

25 Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr
660 665 670



GEN014ESM

Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 675 680 685
 Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser
 690 695 700
 Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys
 705 710 715 720
 5 Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr
 725 730 735
 Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile
 740 745 750
 Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile
 755 760 765
 10 Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys
 770 775 780
 Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro
 785 790 795 800
 Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr
 805 810 815
 15 Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val
 820 825 830
 Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly
 835 840 845
 Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys
 850 855 860
 20 Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro
 865 870 875 880
 Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala
 885 890 895
 Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 900
 <210> 132
 <211> 894
 <212> PRT
 25

GEN014ESM

<213> homo sapiens

<400> 132

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

Pro Glu Asp Lys Ala Val Pro Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Thr Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Pro Val Thr Gly His Ser Ser Gln His Ser Leu
180 185 190

Gln Thr Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240

5

10

15

20

25

GEN014ESM

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 5 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
 10 Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 15 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 20 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 25 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495

GEN014ESM

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

GEN014ESM

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
 5 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830
 10 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
 835 840 845
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
 850 855 860
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
 865 870 875 880
 15 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 885 890
 <210> 133
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 133
 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 20 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
 20 25 30
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45
 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60
 25 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp

GEN014ESM

5

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415

10

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460

15

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

20

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

25

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

GEN014ESM

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830

GEN014ESM

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
 835 840 845
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
 850 855 860
 5 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
 865 870 875 880
 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 885 890
 <210> 134
 <211> 894
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 134
 10 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
 20 25 30
 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 35 40 45
 15 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 50 55 60
 Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 85 90 95
 20 Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
 100 105 110
 Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 115 120 125
 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 130 135 140
 25 Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160

GEN014ESM

5

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Gln Arg Pro His His Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240

10

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255

His Cys Asn Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Val Gly Ile Trp
 260 265 270

Leu Gly Lys Ser Asp Pro Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser
 275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro
 290 295 300

15

Tyr His Ile Arg Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp
 305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350

20

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400

25

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

GEN014ESM

405 410 415

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
435 440 445

5 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
465 470 475 480

Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
485 490 495

10 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

15 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
580 585 590

20 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

25 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
645 650 655

GEN014ESM

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

5 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

10 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

15 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

20 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 135
<211> 894
25 <212> PRT

GEN014ESM

<213> homo sapiens

<400> 135

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

5

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

10

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

15

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165 170 175

20

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220

25

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240

GEN014ESM

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Val Ser Ala Met Arg Asn Gly Ser Gln Val Leu Val Arg
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Val Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Arg Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Thr Arg Glu Val Thr Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Ser Val Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln
 420 425 430
 Pro Leu His His Leu Val Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495

GEN014ESM

Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly

GEN014ESM

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

5 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

10 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

15 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 136
<211> 124
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 136

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

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

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

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

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

GEN014ESM

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

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

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

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

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

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

10 <210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 141

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

15 <210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 142

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

20 <210> 143
<211> 123
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 143

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

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

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

GEN014ESM

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Val Gln Asn Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp His Ile Ser Met Leu Arg Gly Ile Ile Ile Arg Asn Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 144
<211> 108
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 144

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

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

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

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

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

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

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

<210> 145
<211> 124
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 145

5

10

15

20

25

GEN014ESM

1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 5 5 10 15
 20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
 25 30
 35 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 40 45
 50 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 55 60
 65 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 70 75 80
 85 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 90 95
 100 Ala Arg Glu Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Glu Tyr Phe Gln
 105 110
 115 His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 120
 <210> 146
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 146
 1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 25 30
 35 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 40 45
 50 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Phe Pro Asp Arg Phe Ser
 55 60
 65 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 70 75 80
 85 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 90 95

GEN014ESM

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

<210> 147
 <211> 893
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 147

5 Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Gly Trp Val Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu
 20 25 30

Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly
 35 40 45

10 Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro
 50 55 60

Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Ser
 65 70 75 80

Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp Ile
 85 90 95

15 Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ser Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly
 100 105 110

Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Asn Phe Val Ser Gln
 115 120 125

Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro
 130 135 140

20 Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln
 145 150 155 160

Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala
 165 170 175

Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Asn Leu His
 180 185 190

25 Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn
 195 200 205



GEN014ESM

	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro
		210					215					220				
	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu
	225					230					235					240
	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His
					245					250					255	
5	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln	Ala
				260					265					270		
	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Ala	Ser	Val
			275					280					285			
	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro	Tyr
		290					295					300				
10	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp	Thr
	305					310					315					320
	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro
					325					330					335	
	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His	Trp
				340					345					350		
15	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu
			355					360					365			
	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu
		370					375					380				
	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Asn
	385					390					395					400
20	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp
				405						410					415	
	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro
				420					425					430		
	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp	Pro
			435					440					445			
25	Trp	Trp	Tyr	Ile	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val	Leu
	450						455					460				

GEN014ESM

Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr
 465 470 475 480

Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg
 485 490 495

Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu
 500 505 510

5 Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val
 515 520 525

Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly
 530 535 540

Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile
 545 550 555 560

10 Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser
 565 570 575

Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp
 580 585 590

His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu
 595 600 605

15 Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His
 610 615 620

Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro
 625 630 635 640

Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala
 645 650 655

20 Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu
 660 665 670

Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala
 675 680 685

Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln
 690 695 700

25 Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu

GEN014ESM

705 710 715 720

Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
725 730 735

Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val
740 745 750

Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys
755 760 765

Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys
770 775 780

Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu
785 790 795 800

Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp
805 810 815

Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Tyr Pro Glu Pro
820 825 830

Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Leu Asp Pro Lys
835 840 845

Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ser Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg
850 855 860

Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp
865 870 875 880

Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 148
<211> 903
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
20 25 30

Tyr Ala Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly

GEN014ESM

Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg
 290 295 300

Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys
 305 310 315 320

Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val Glu
 325 330 335

5

 Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr
 340 345 350

Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro
 355 360 365

Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp
 370 375 380

10

 Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu
 385 390 395 400

Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val Ala
 405 410 415

Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu
 420 425 430

15

 Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val Lys
 435 440 445

Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu
 450 455 460

Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu
 465 470 475 480

20

 Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro
 485 490 495

Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser
 500 505 510

Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser
 515 520 525

25

 Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys
 530 535 540

GEN014ESM

Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met
 545 550 555 560

Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys
 565 570 575

Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu
 580 585 590

5 Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg
 595 600 605

Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala
 610 615 620

Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe
 625 630 635 640

10 Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln
 645 650 655

Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu
 660 665 670

Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met
 675 680 685

15 Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys
 690 695 700

Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met
 705 710 715 720

Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr
 725 730 735

20 Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala
 740 745 750

Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr
 755 760 765

Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu
 770 775 780

25 Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln
 785 790 795 800

GEN014ESM

Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu
 805 810 815
 Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn
 820 825 830
 Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly
 835 840 845
 5 Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu
 850 855 860
 Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser
 865 870 875 880
 Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala
 885 890 895
 10 Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 900
 <210> 149
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 149
 15 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
 35 40 45
 20 Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
 50 55 60
 Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
 65 70 75 80
 Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
 85 90 95
 25 Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
 100 105 110

GEN014ESM

	Arg	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gln	Cys	Met
			115					120					125			
	Val	His	Leu	Glu	Gly	Arg	Thr	Phe	Val	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Gly
		130					135					140				
	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Lys	Ala	Val
	145					150					155					160
5	Pro	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro
					165					170					175	
	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Pro
				180					185					190		
	Val	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	Asn
			195					200					205			
10	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr
		210					215					220				
	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	His	His
	225					230					235					240
	Leu	His	Val	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr
					245					250					255	
15	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	Cys	Asn	Leu	Gln	Ala
				260					265					270		
	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Val	Gly	Ile	Trp	Leu	Gly	Lys	Ser	Asp	Pro
			275					280					285			
	Pro	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu
		290					295					300				
20	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ile	Ser
	305					310					315					320
	Cys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val
					325					330					335	
	Glu	Thr	Thr	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ala
				340					345					350		
25	Met	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val

GEN014ESM

		355				360						365					
		Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln
		370						375				380					
		Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Thr
		385					390					395					400
5		Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Val	Ala	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val
					405						410					415	
		Thr	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro
					420					425					430		
		Leu	Glu	Pro	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Pro	Leu	His	His	Leu	Val
				435					440					445			
10		Ser	Glu	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Phe	Ser	Trp	Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu
			450					455					460				
		Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe
		465					470					475					480
		Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu
					485						490					495	
15		Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Lys
					500					505					510		
		Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Ile
				515					520					525			
		Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Arg	Asp	Val	Met	Val	Asp	Arg	His
			530					535					540				
20		Lys	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	Gly	Glu	Phe	Gly	Ala	Val
		545				550						555					560
		Met	Glu	Gly	Gln	Leu	Asn	Gln	Asp	Asp	Ser	Ile	Leu	Lys	Val	Ala	Val
					565						570					575	
		Lys	Thr	Met	Lys	Ile	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe
					580					585					590		
25		Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Val	Met
				595					600					605			

GEN014ESM

	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro
	610						615					620				
	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	His	Ser
	625					630					635					640
	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln	Pro	Val	Tyr	Leu	Pro	Thr
					645					650					655	
5	Gln	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Glu	Tyr
				660					665					670		
	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Phe	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys
			675					680					685			
	Met	Leu	Asn	Glu	Asn	Met	Ser	Val	Cys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser
		690					695					700				
10	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys
	705					710					715					720
	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr
					725					730					735	
	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile
				740					745					750		
15	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile
			755					760					765			
	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys
		770					775					780				
	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro
		785				790					795					800
20	Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr
					805					810					815	
	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val
				820					825					830		
	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly
			835					840					845			
25	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys
		850					855					860				

GEN014ESM

Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro
865 870 875 880

Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala
885 890 895

Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
900

5 <210> 150
<211> 888
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 150

Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Trp Leu Ala Leu Cys Cys Trp Gly
1 5 10 15

10 Cys Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
20 25 30

Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
35 40 45

Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
50 55 60

15 Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
65 70 75 80

Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu
85 90 95

Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met
100 105 110

20 Val His Leu Glu Gly Arg Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Phe Val Gly
115 120 125

Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Arg Thr Val
130 135 140

Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro
145 150 155 160

25 Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Thr
165 170 175

GEN014ESM

Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu His Val Pro Gly Leu Asn
180 185 190

Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr
195 200 205

Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn
210 215 220

5 Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu Leu Glu Val Ala Trp Thr
225 230 235 240

Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala
245 250 255

Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro
260 265 270

10 Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu
275 280 285

Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala
290 295 300

Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu Pro Val
305 310 315 320

15 Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Ile Ser Ala
325 330 335

Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His Trp Gln Glu Pro Arg Ala
340 345 350

Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Gly Gln
355 360 365

20 Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr
370 375 380

Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser Asn Leu Thr Val Cys Val
385 390 395 400

Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro
405 410 415

25 Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln Pro Val His Gln Leu Val
420 425 430

GEN014ESM

Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu
 435 440 445
 Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe
 450 455 460
 Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu
 465 470 475 480
 5 Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys
 485 490 495
 Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile
 500 505 510
 Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His
 515 520 525
 10 Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val
 530 535 540
 Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val
 545 550 555 560
 Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe
 565 570 575
 15 Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met
 580 585 590
 Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro
 595 600 605
 Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser
 610 615 620
 20 Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr
 625 630 635 640
 Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr
 645 650 655
 Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys
 660 665 670
 25 Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser

GEN014ESM

		675					680						685			
	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Gly	Arg	Ile	Ala	Lys
		690					695						700			
	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr
	705					710						715				720
5	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile
					725					730					735	
	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile
				740					745					750		
	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Ala	Asp	Cys
			755					760					765			
10	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro
		770					775						780			
	Gln	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr
		785				790					795					800
	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val
					805					810					815	
	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly
15				820					825					830		
	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys
			835					840					845			
	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Val	His	Pro	Ala	Gly	Arg	Tyr	Val	Leu	Cys	Pro
		850					855					860				
	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Asp	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala
20						870					875					880
	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala								
						885										
	<210>	151														
	<211>	894														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificiale														
	<220>															
25	<223>	Costrutto di proteina chimerica														

GEN014ESM

<400> 151

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

5

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

10

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

15

Pro Glu Asp Lys Ala Val Pro Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Thr Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Pro Val Thr Gly His Ser Ser Gln His Ser Leu
180 185 190

20

Gln Thr Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240

25

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr

GEN014ESM

					245					250					255	
	His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln
				260					265					270		
	Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser
			275					280					285			
5	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	
10	Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His
				340					345					350		
	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg
			355					360					365			
	Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly
		370					375					380				
15	Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser
	385					390					395					400
	Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro
					405					410					415	
	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln
				420					425					430		
20	Pro	Val	His	Gln	Leu	Val	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp
			435					440					445			
	Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val
		450					455					460				
	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg
	465					470					475					480
25	Tyr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Val	Val
					485					490					495	

GEN014ESM

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

5

 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

10

 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

15

 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

20

 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

25

 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750

GENO14ESM

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

5 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

10 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

15 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 152
<211> 894
<212> PRT
<213> Artificiale

<220>
<223> Costrutto di proteina chimerica

<400> 152

20 Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

25 Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

GEN014ESM

5
 10
 15
 20
 25

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
 100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 130 135 140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220

Pro Gln Arg Pro His His Leu His Val Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255

His Cys Asn Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Val Gly Ile Trp
 260 265 270

Leu Gly Lys Ser Asp Pro Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser
 275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro
 290 295 300

Tyr His Ile Arg Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp
 305 310 315 320

GEN014ESM

5

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
 340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415

10

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430

Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460

15

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

20

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

25

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575

GEN014ESM

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
 595 600 605
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
 610 615 620
 His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
 645 650 655
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
 660 665 670
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750
 Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765
 Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
 770 775 780
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu

GEN014ESM

820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

5 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
885 890

<210> 153
<211> 894
<212> PRT
<213> Artificiale

10 <220>
<223> Costrutto di proteina chimerica

<400> 153

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

15 Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

20 Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

25 Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

GEN014ESM

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 145 150 155 160
 Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 165 170 175
 Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 180 185 190
 His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 195 200 205
 Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
 210 215 220
 Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
 245 250 255
 His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
 260 265 270
 Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
 275 280 285
 Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
 290 295 300
 Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
 305 310 315 320
 Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
 325 330 335
 Pro Glu Asn Val Ser Ala Met Arg Asn Gly Ser Gln Val Leu Val Arg
 340 345 350
 Trp Gln Glu Pro Arg Val Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Leu Ala Tyr Arg Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
 370 375 380
 Leu Thr Arg Glu Val Thr Leu Glu Leu Arg Gly Asp Arg Pro Val Ala

GEN014ESM

	385					390						395				400
	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro
					405					410					415	
	Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Pro	Trp	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln
				420					425					430		
5	Pro	Leu	His	His	Leu	Val	Ser	Glu	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Phe	Ser	Trp
			435					440					445			
	Pro	Trp	Trp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val
		450					455					460				
	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	His	Arg	Arg	Lys	Lys	Glu	Thr	Arg
	465					470					475					480
10	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			
15	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	
20	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Met	Lys	Glu	Phe
				580					585					590		
	Asp	His	Pro	Asn	Val	Met	Arg	Leu	Ile	Gly	Val	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser
			595					600					605			
	Glu	Arg	Glu	Ser	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Phe	Met	Lys
	610						615					620				
25	His	Gly	Asp	Leu	His	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Gln
	625					630					635					640

GEN014ESM

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
 5 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
 10 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
 15 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830
 20 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
 835 840 845
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
 850 855 860
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
 865 870 875 880
 25 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 885 890

GEN014ESM

5
<210> 154
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 154
aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg 30

10
<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 155
acggacggca ggaccact 18

15
<210> 156
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 156
acggacggca ggaccactaa gcagtgggat caacgcaga 39

20
<210> 157
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 157
cagcaggcac accactgagg cagttccaga tttc 34

25
<210> 158
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 158
acggacggca ggaccagt 18

<210> 159
<211> 41



GEN014ESM

<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 159
acggacggca ggaccagtaa gcagtggat caacgcagag t 41

5

<210> 160
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 160
ggaggagggc gccagtggga agaccga 27

10

<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 161
gccagatata cgcgttgaca 20

15

<210> 162
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificiale

<220>
<223> Primer

<400> 162
gatctgctat ggcaggcct 20

20



RIVENDICAZIONI

1. Coniugato anticorpo-farmaco (ADC) comprendente un anticorpo che si lega a AXL umano per l'uso nel trattamento di un cancro resistente ad almeno un agente terapeutico selezionato dal
5 gruppo costituito da un inibitore di tirosina chinasi, un inibitore di serina/treonina chinasi e un agente chemioterapico, in cui l'ADC comprende almeno una regione di legame che comprende una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze
10 CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente.

2. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'inibitore di tirosina chinasi è selezionato dal gruppo costituito da erlotinib, afatinib, gefitinib, lapatinib, osimertinib, rociletinib, imatinib, sunitinib, crizotinib, midostaurin (PKC412) e quizartinib (AC220).

15 3. L'ADC per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'inibitore di serina/treonina chinasi è un inibitore di BRAF o un inibitore di MEK.

4. L'ADC per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui

20 a) l'inibitore di BRAF è selezionato dal gruppo costituito da vemurafenib (PLX4032), dabrafenib e un analogo o derivato terapeuticamente efficace di uno qualsiasi di essi, come PLX4720;
(b) l'inibitore di MEK selezionato tra trametinib e selumetinib (AZD6244) e un analogo o derivato terapeuticamente efficace di uno qualsiasi di essi.

25 5. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'agente



chemioterapico è selezionato dal gruppo costituito da paclitaxel, docetaxel, cisplatino, metformina, doxorubicina, etoposide, carboplatino o una loro combinazione.

5 6. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

a) l'inibitore di tirosina chinasi è selezionato tra un antagonista del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), un antagonista di HER2, un inibitore di ALK e un inibitore di FLT3, o una combinazione di qualsiasi di essi;

10 (b) l'inibitore di serina/treonina chinasi è selezionato tra un inibitore di BRAF e un inibitore di MEK, o una loro combinazione;

(c) l'agente chemioterapico è selezionato tra paclitaxel, docetaxel, cisplatino, metformina, doxorubicina, etoposide, carboplatino o una loro combinazione.

15 7. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui

(a) l'inibitore di tirosina chinasi è un inibitore di EGFR;

(b) l'inibitore di serina/treonina chinasi è un inibitore di BRAF; e

(c) l'agente chemioterapico è un taxano.

20 8. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il cancro è un cancro che esprime AXL.

25 9. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il cancro è selezionato tra un melanoma, un cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC), un cancro cervicale, un carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (SCCHN), un cancro



mammario, un tumore stromale gastrointestinale (GIST), un cancro renale, un cancro prostatico, un neuroblastoma, un cancro pancreatico, un cancro esofageo, un rhabdomyosarcoma, una leucemia mieloide acuta (AML) o una leucemia mieloide cronica (CML).

5 10. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è per l'uso in combinazione con l'agente terapeutico, in cui l'ADC e l'agente terapeutico sono somministrati contemporaneamente, separatamente o sequenzialmente.

10 11. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per l'uso nel trattamento di un NSCLC resistente ad un agente di inibizione di EGFR, come erlotinib.

12. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è per l'uso nel trattamento di un melanoma resistente a vemurafenib.

15 13. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è per l'uso nel trattamento di un cancro cervicale resistente a paclitaxel o un suo analogo o derivato terapeuticamente efficace, come docetaxel.

20 14. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'ADC comprende un agente citotossico, un farmaco chemioterapico o un radioisotopo collegato all'anticorpo.

15. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la porzione terapeutica è un agente citotossico, facoltativamente collegato all'ADC mediante un linker.

25 16. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 15, in cui l'agente



citotossico è collegato all'anticorpo con un linker scindibile, come N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-pentanoato (SSP), maleimidocaproil-valina-citrullina-p-amminobenzilossicarbonile (mc-vc-PAB) o AV-1 K-lock valina-citrullina.

5 17. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 16, in cui l'agente citotossico è collegato all'anticorpo con un linker non scindibile, come succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloesano-1-carbossilato (MCC) o maleimidocaproile (MC).

10 18. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 17, in cui l'agente citotossico è selezionato dal gruppo costituito da agenti che bersagliano DNA, ad es. alchilanti e reticolanti del DNA, come calicheamicina, duocarmicina, rachelmicina (CC-1065), pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepine (PBD) e indolinobenzodiazepina (IGN); agenti
15 che bersagliano microtuboli come duostatina, come duostatina-3, auristatina, come la monometil auristatina E (MMAE) e la monometil auristatina-F (MMAF), dolastatina, maytansina, N(2')-deacetil-N(2')-(3-marcapto-1-ossopropil)-maytansina (DM1), e tubulisina; e analoghi nucleosidici; o loro analoghi, derivati o profarmaci.

20 19. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 18, in cui

(a) il linker è scindibile e l'agente citotossico ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander;

(b) il linker è scindibile e l'agente citotossico non ha la
25 capacità di uccidere mediante effetto bystander;



(c) il linker non è scindibile e l'agente citotossico ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander; o

(d) il linker non è scindibile e l'agente citotossico non ha la capacità di uccidere mediante effetto bystander.

5 20. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 19, in cui il linker è mc-vc-PAB e l'agente citotossico è MMAE.

21. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 19, in cui il linker è SSP e l'agente citotossico è DM1.

10 22. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 a 19, in cui il farmaco è duostatina-3.

23. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la sequenza amminoacidica dell'AXL umano è come specificato in SEQ ID No: 130.

15 24. L'ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che si lega a AXL di scimmia cynomolgus come specificato in SEQ ID No: 147.

25. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo comprende almeno una regione di legame comprendente una regione VH che è almeno il 90%, come almeno il 95%, come almeno il 97%, come almeno il 99% identica a SEQ ID No: 1, e una regione VL che è almeno il 90%, come almeno il 95%, come almeno il 97%, come almeno al 99% identica a SEQ ID No.: 2 [107].

26. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'almeno una regione di legame comprende una regione VH comprendente SEQ ID No: 1 e una regione VL comprendente



SEQ ID No: 2 [107].

27. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

5 l'anticorpo comprende almeno una regione di legame comprendente una regione VH comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di SEQ ID No.: 36, 37 e 38, rispettivamente; e una regione VL comprendente le sequenze CDR1, CDR2, e CDR3 di SEQ ID No.: 39, GAS e 40, rispettivamente, [107],

il linker è mc-vc-PAB e

10 l'agente citotossico è MMAE.

28. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo si lega a un epitopo su AXL in cui l'epitopo è riconosciuto da uno qualsiasi degli anticorpi definiti nella rivendicazione 19.

15 29. L'ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo si lega a un epitopo all'interno del dominio Ig1 di AXL, l'epitopo comprendendo o richiedendo uno o più amminoacidi corrispondenti alle posizioni da L121 a Q129 o da T112 a Q124 di AXL umano.

20 30. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo comprende una catena pesante di un isotipo selezionato dal gruppo costituito da IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

31. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 30, in cui l'isotipo è IgG1, facoltativamente allotipo IgG1m(f).

25 32. ADC secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti,



che è un anticorpo monoclonale di lunghezza intera, come un anticorpo IgG1, κ monoclonale di lunghezza intera.

33. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 32, in cui l'anticorpo è un anticorpo carente di funzione
5 effettrice, un anticorpo IgG4 stabilizzato o un anticorpo monovalente.

34. ADC per l'uso secondo la rivendicazione 33, in cui la catena pesante è stata modificata in modo tale che l'intera regione di cerniera è stata cancellata.

35. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni
10 33 e 34, in cui la sequenza dell'anticorpo è stata modificata in modo tale che essa non comprende siti accettori per glicosilazione legata all'N.

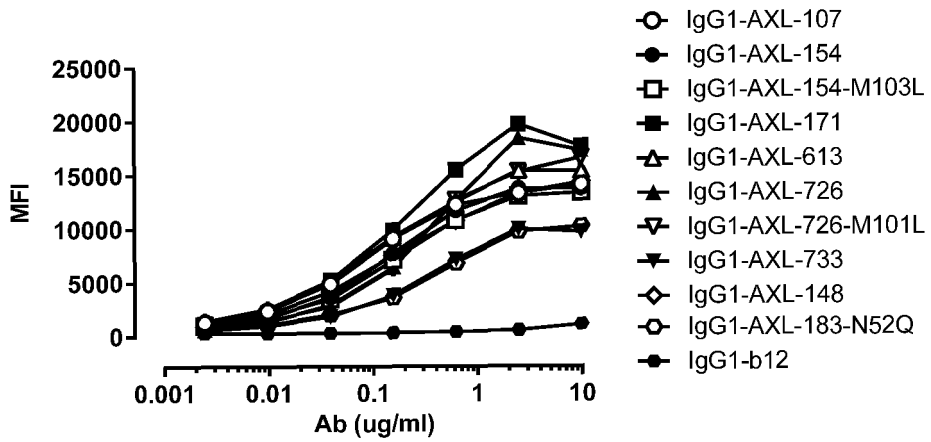
36. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'anticorpo è un anticorpo a catena singola.

37. ADC per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni
15 precedenti, in cui l'anticorpo è un anticorpo bispecifico comprendente una prima regione di legame di un anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, e una seconda regione di legame che lega un bersaglio o epitopo diverso rispetto alla prima regione di legame.

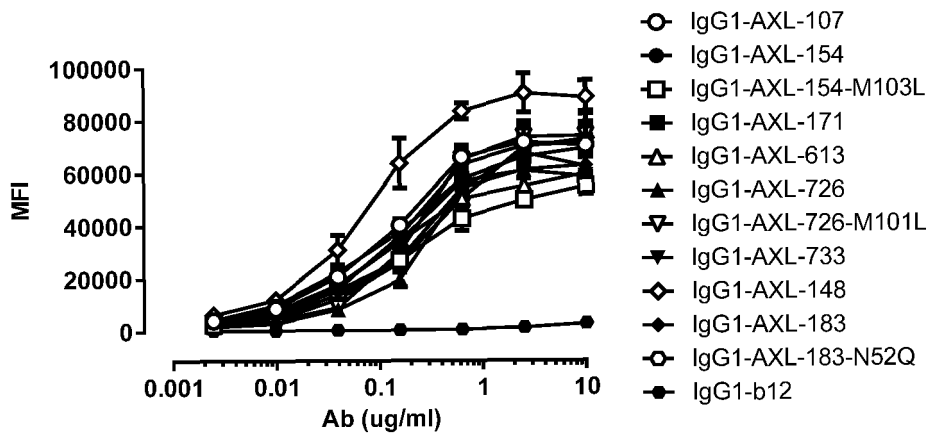


Figura 1

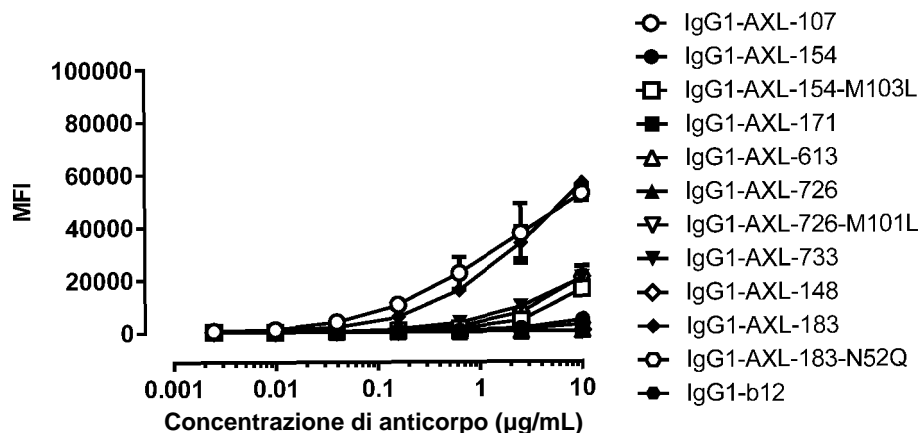
A



B

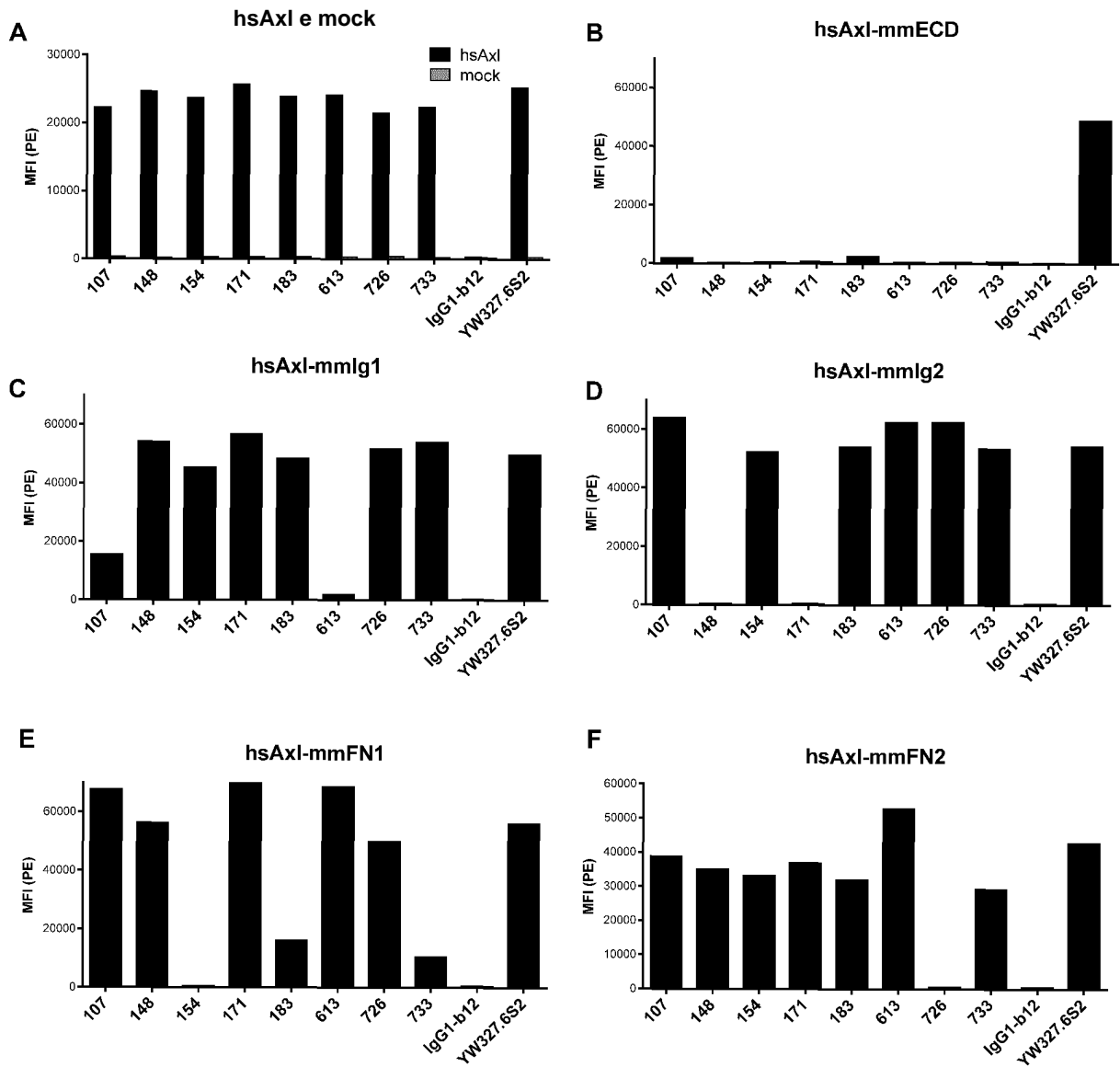


C



Poligo Montebell

Figura 2



Polyo Montech

Figura 3

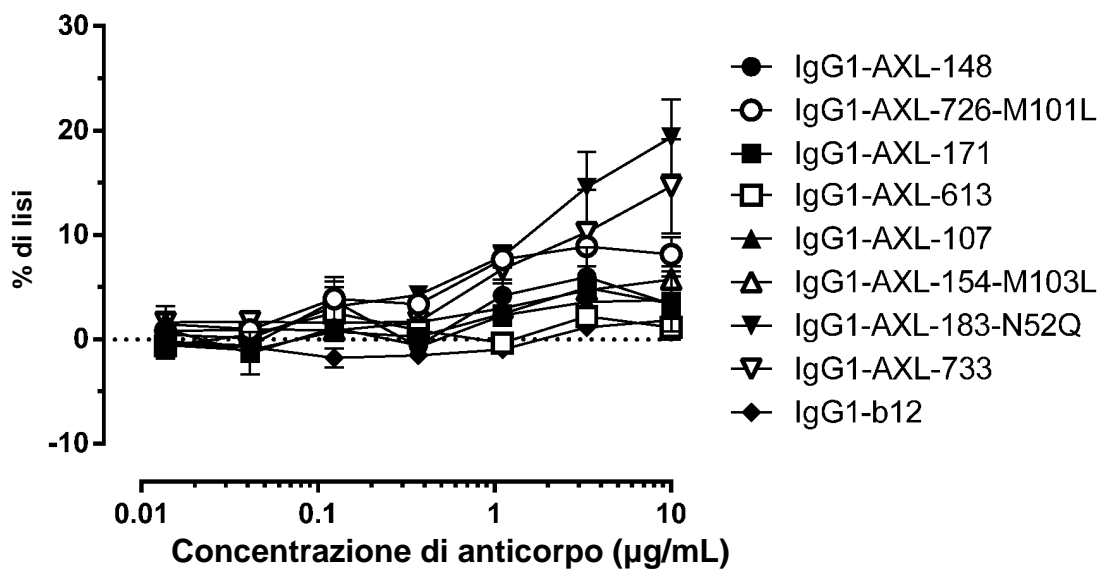
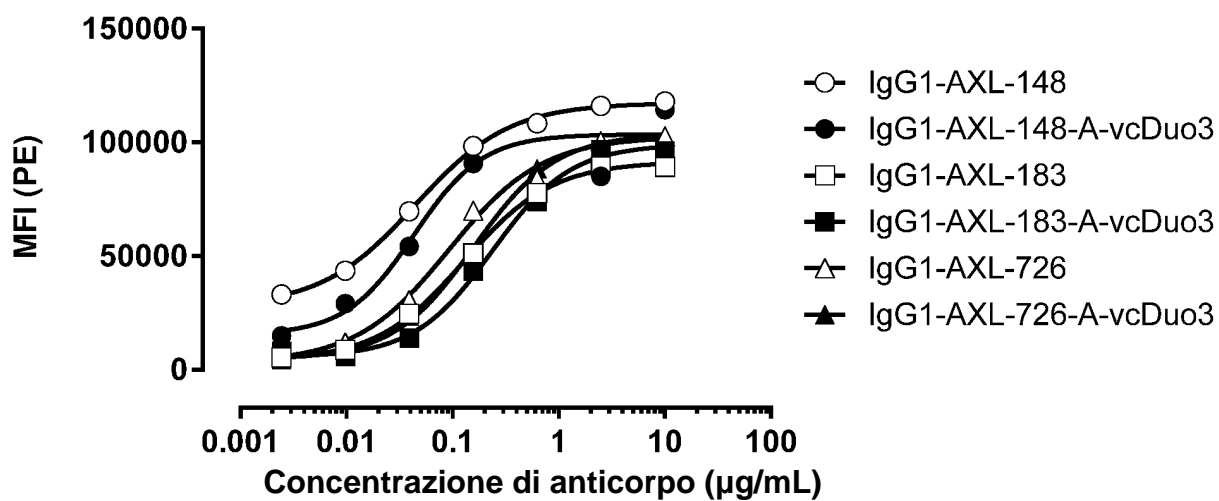


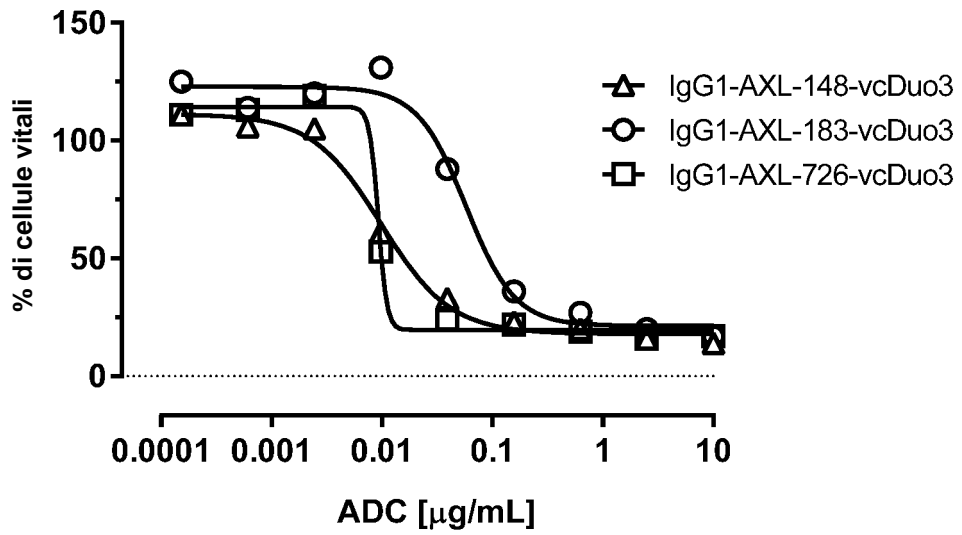
Figura 4



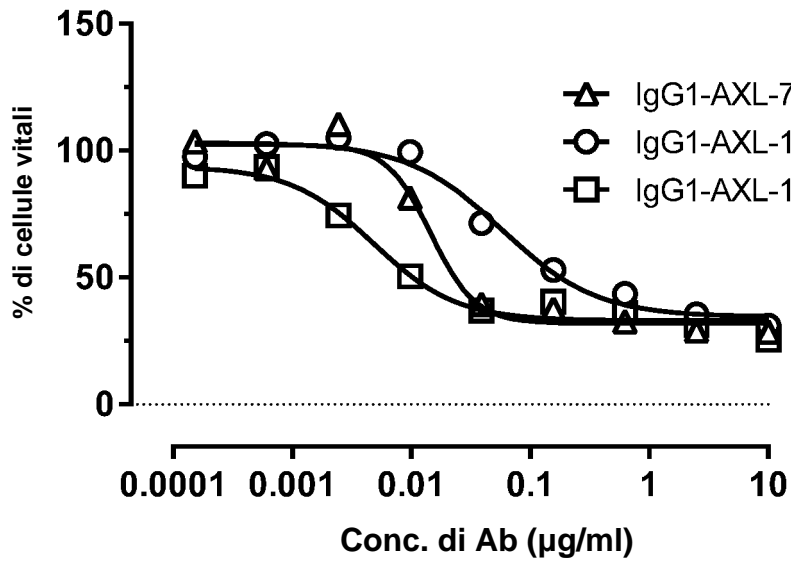
Polypo Montebelloni

Figura 5

A



B



Polyplo Montech

Figure 6

A

HC-IgG1-AXL-140 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTWVRQAPGKGLWYSAISGCASTFYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 120
HC-IgG1-AXL-148 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMTWVRQAPGKGLWYSAISGCASTFYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 110

CDR1 CDR2 CDR3

B

HC-IgG1-AXL-187 QVQLQWAGLLKPKSETLSLTCALVIGGSFSGYHNSWIRQPPGKGLWYSAISGCASTFYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 120
HC-IgG1-AXL-726 QVQLQWAGLLKPKSETLSLTCALVIGGSFSGYHNSWIRQPPGKGLWYSAISGCASTFYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 110

CDR1 CDR2 CDR3

C

HC-IgG1-AXL-171 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 120
HC-IgG1-AXL-172 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 110
HC-IgG1-AXL-181 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 120

CDR1 CDR2 CDR3

D

HC-IgG1-AXL-608-01 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSYAISSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 124
HC-IgG1-AXL-610-01 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSYAISSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 110
HC-IgG1-AXL-613 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSYAISSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 124
HC-IgG1-AXL-620-06 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSYAISSWVRQAPGKGLWYSDISVSGGTYADSVKGRFTISRDNSKNTIISLQMNSLRAEDTAVYFCRGGSYVYDAFDHWGGGTMVTVSS 110

CDR1 CDR2 CDR3

E

LC-IgG1-AXL-613-08 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQCKPKGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGDFTLTISSELEPEDFAVYCCQQRSNWLTFGGSTTKVEIK 107
LC-IgG1-AXL-613 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQCKPKGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGDFTLTISSELEPEDFAVYCCQQRSNWLTFGGSTTKVEIK 100

CDR1 CDR2 CDR3

Figura 7

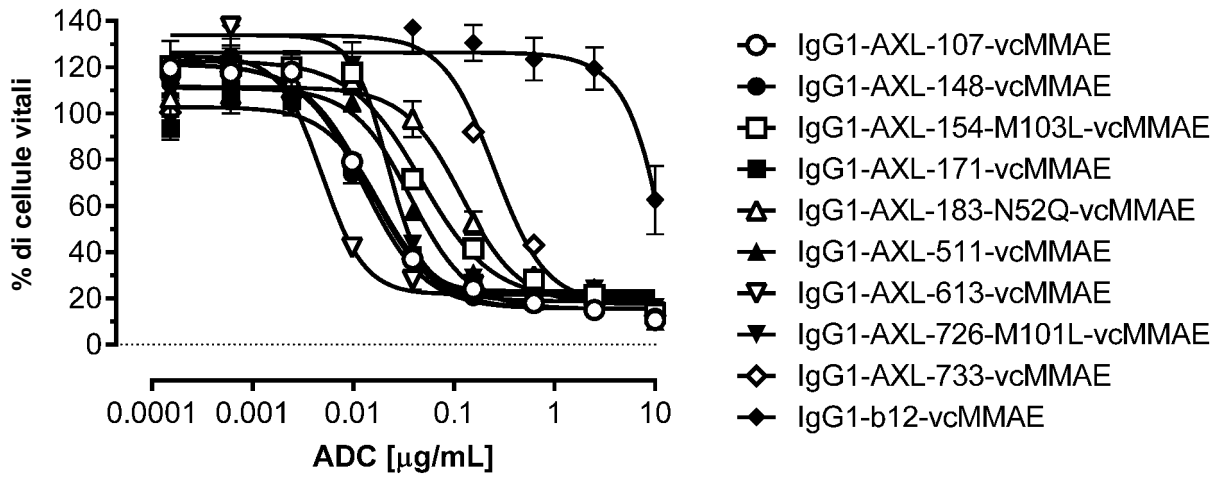
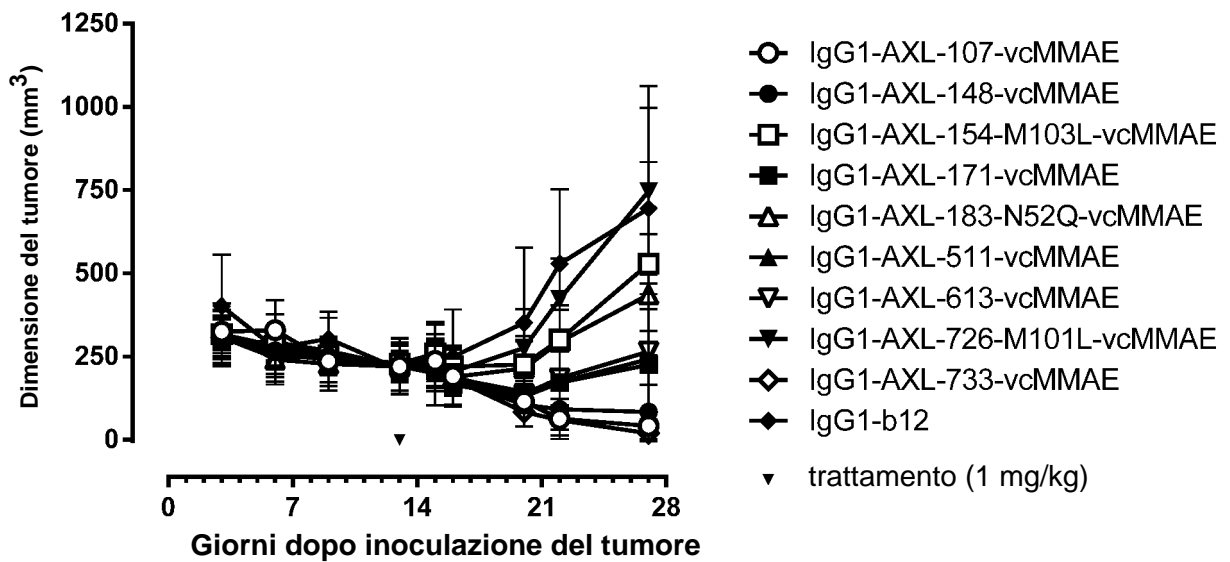
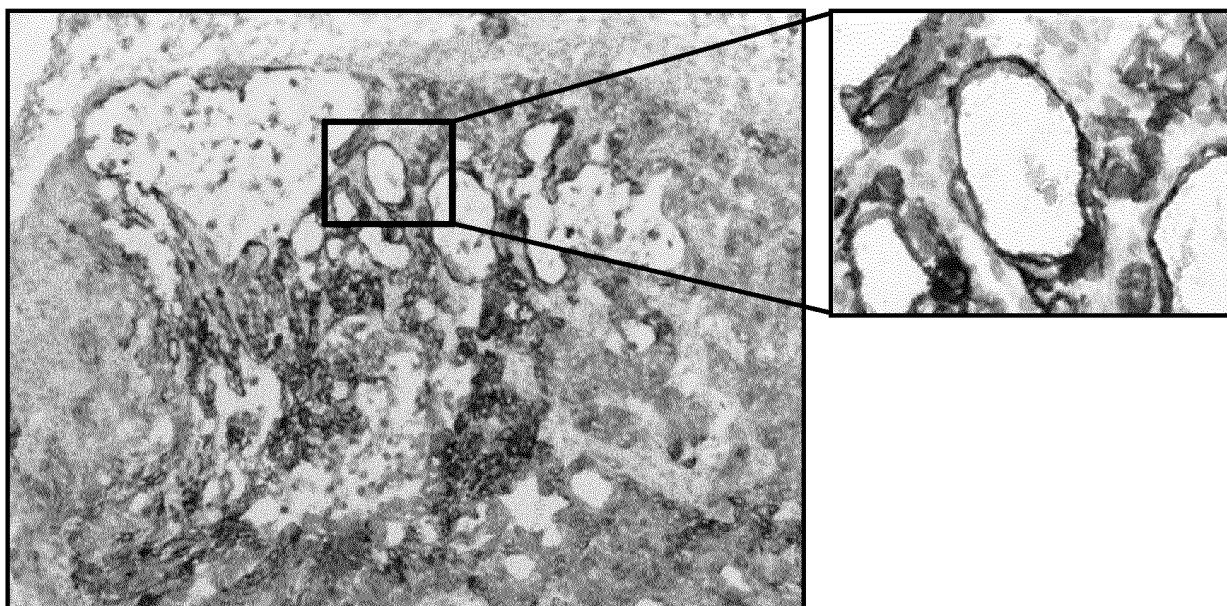


Figura 8



Mylo Montch

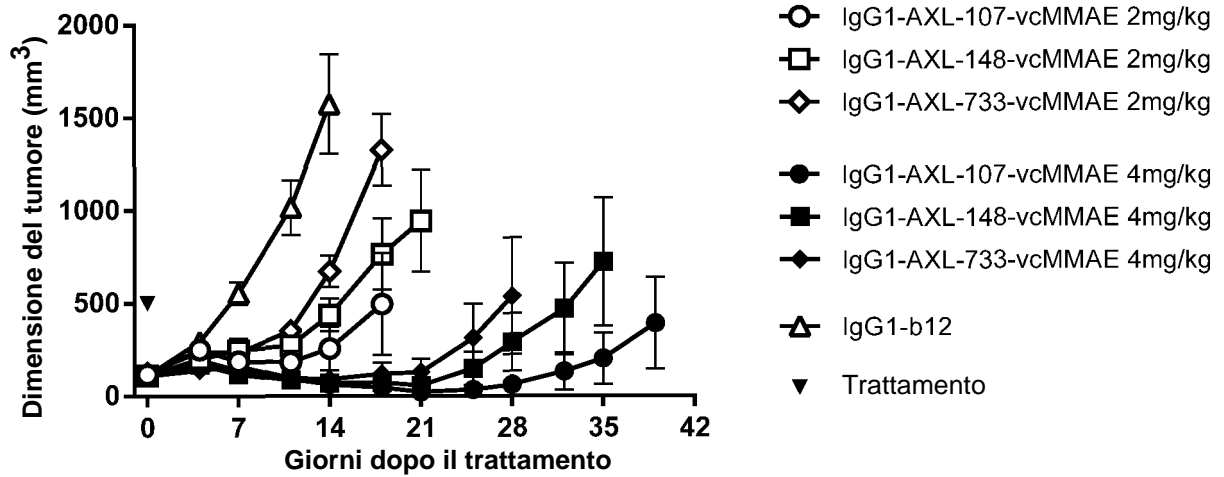
Figura 9



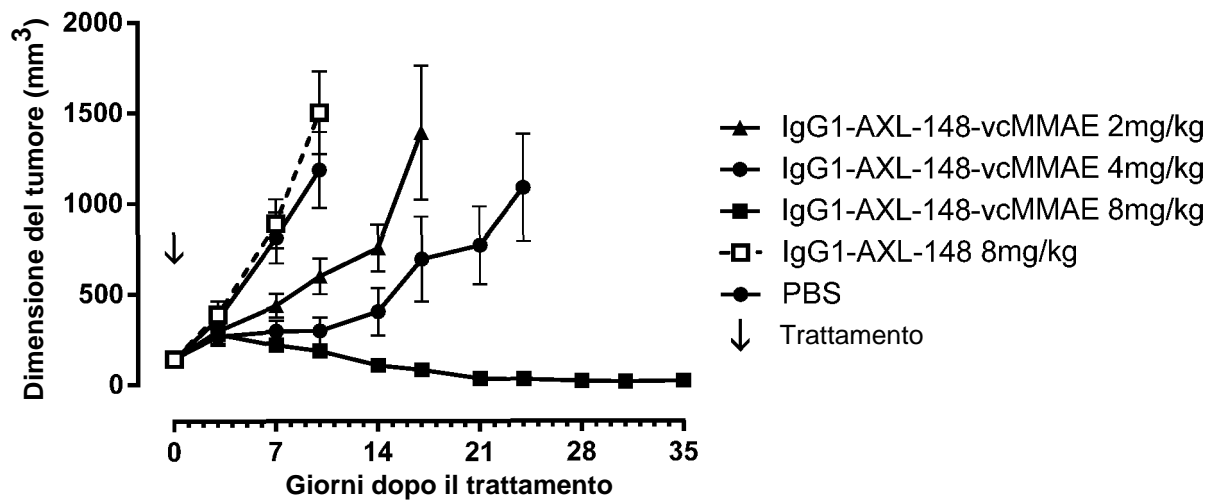
Polys Montel

Figura 10

A



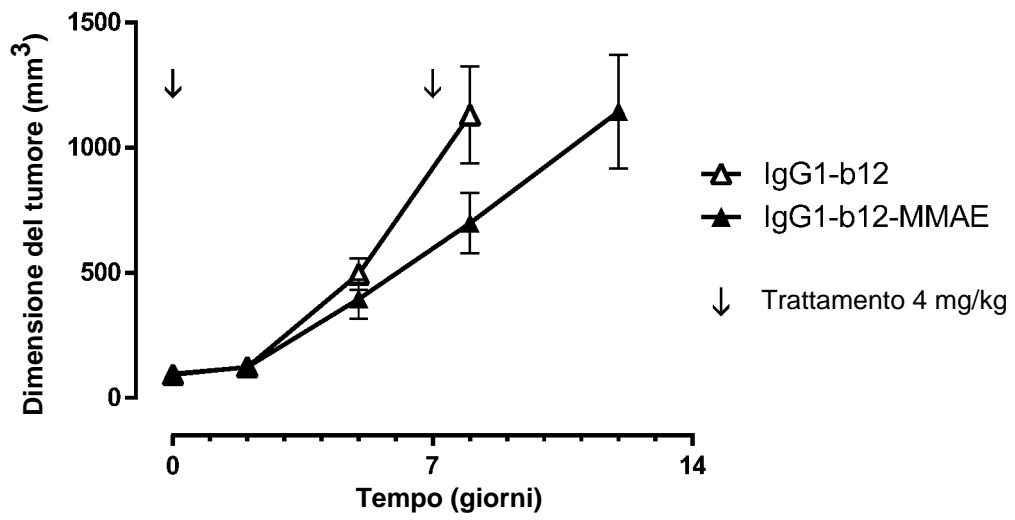
B



Polyp Montech

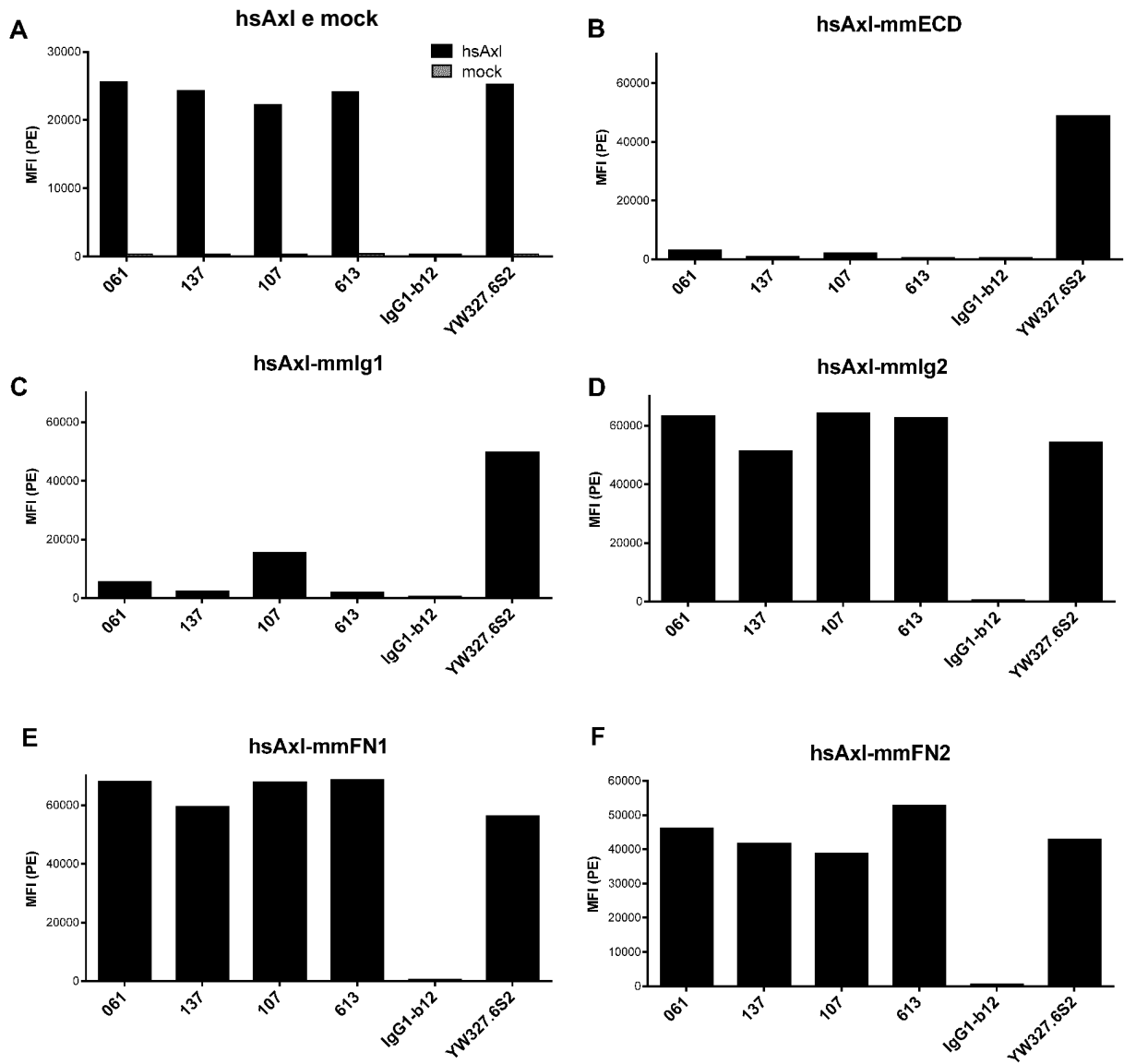
Figura 10 (continuata)

C



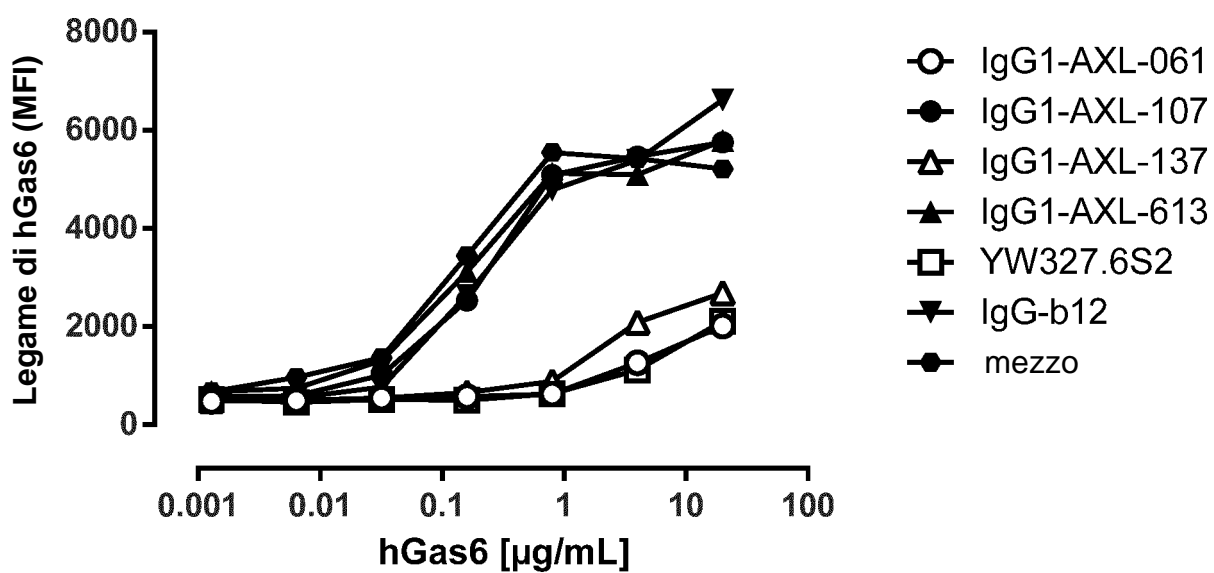
Miljo Montel

Figura 11



Polya Montech

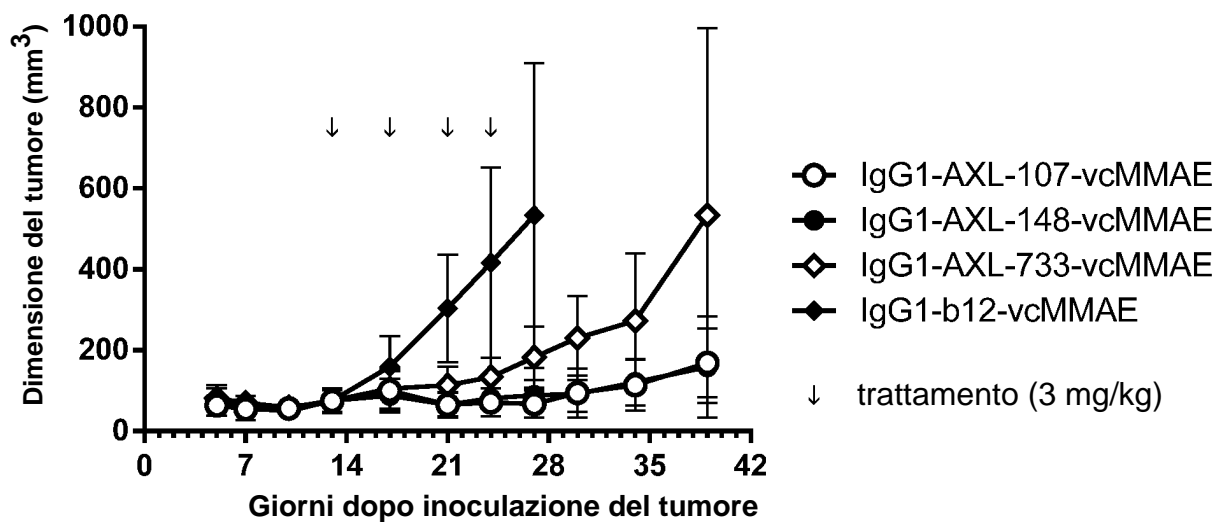
Figura 12



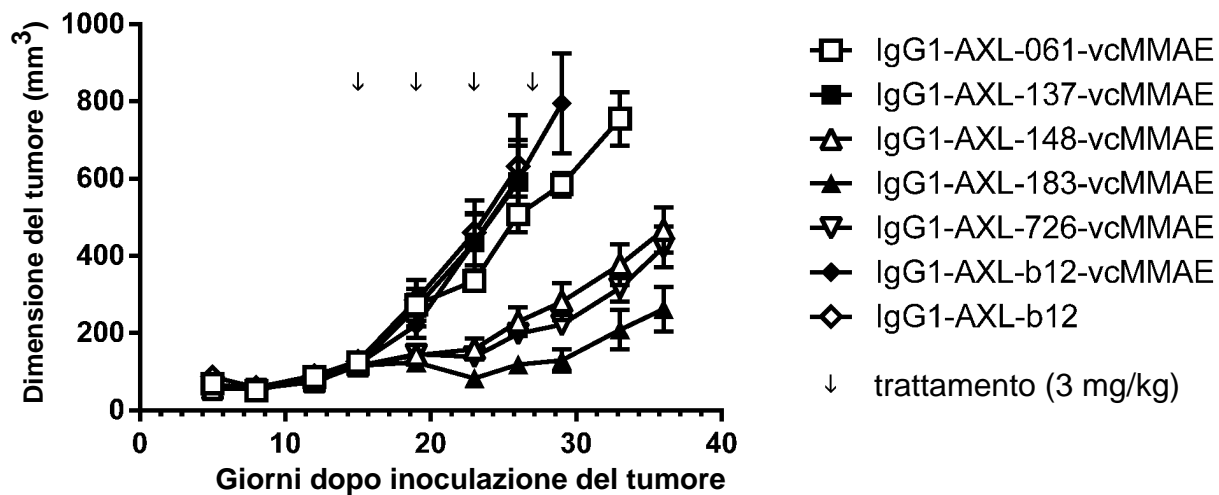
Poligo Montech

Figura 13

A



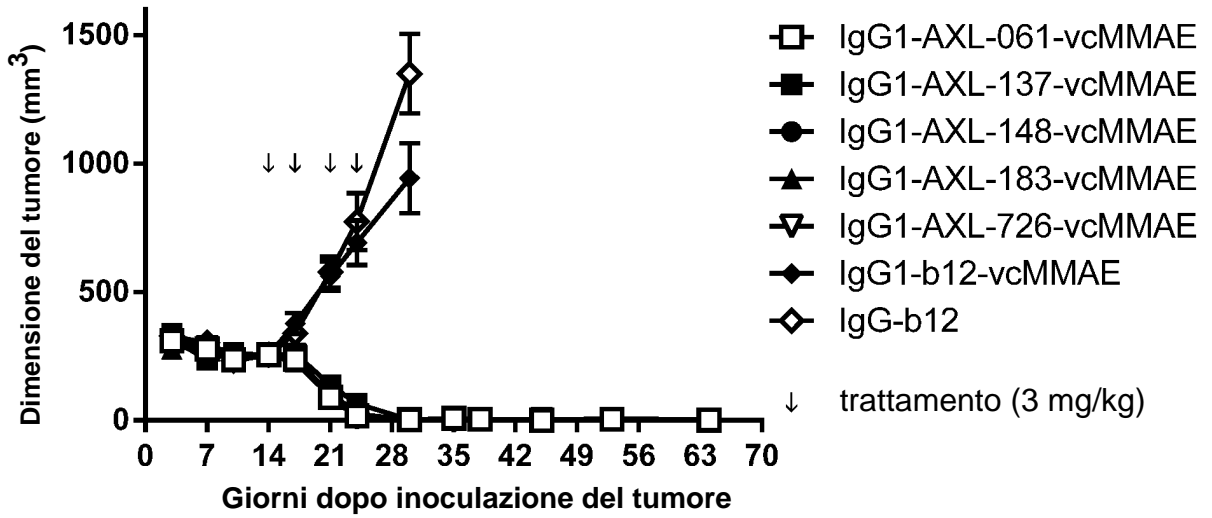
B



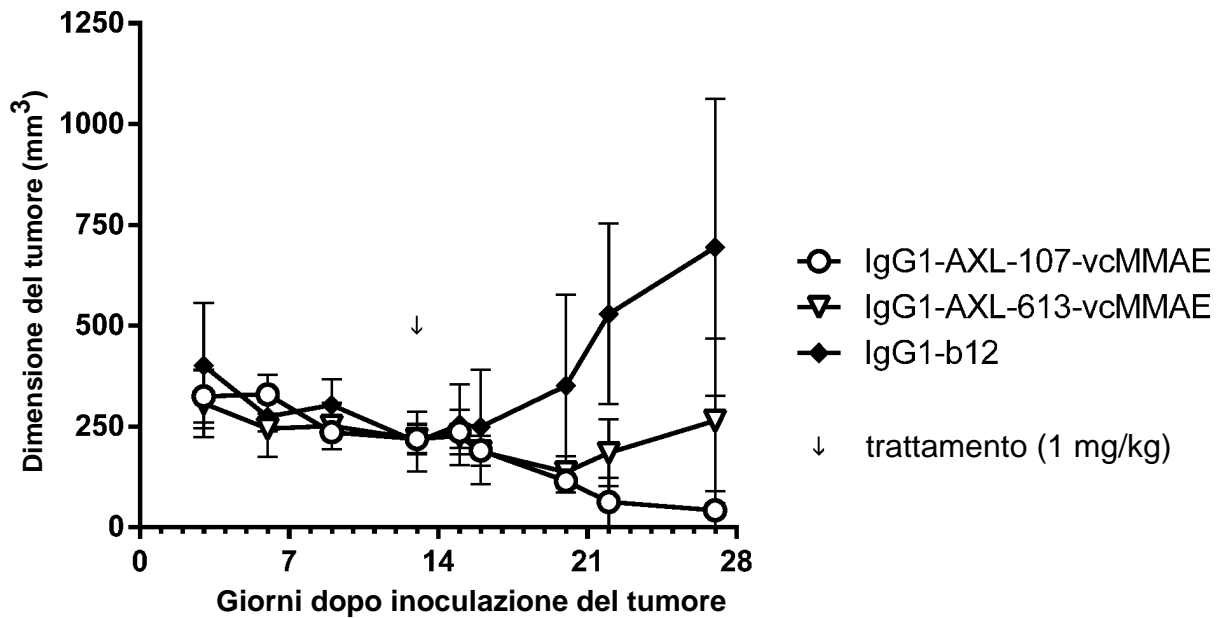
Polypio Montech

Figura 14

A



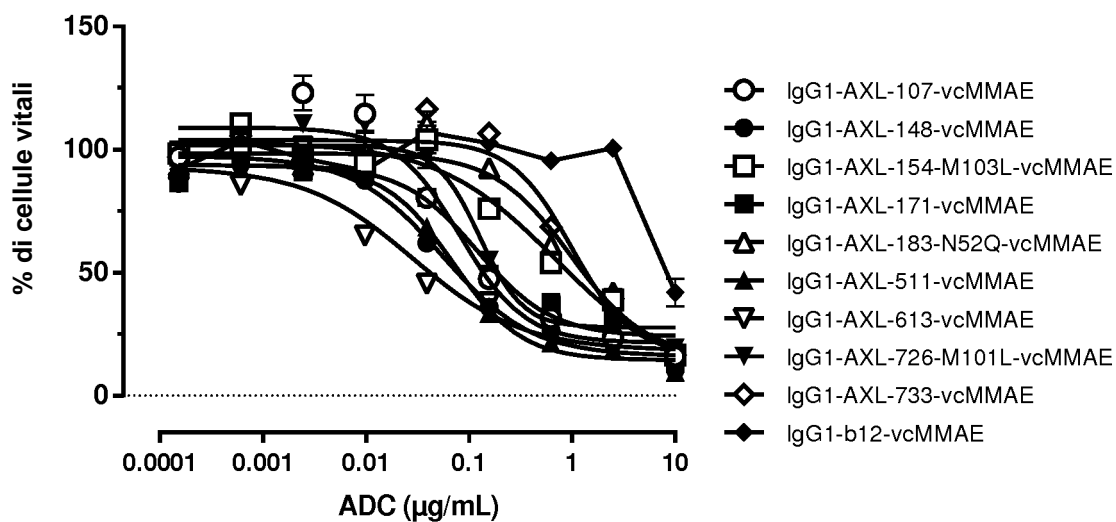
B



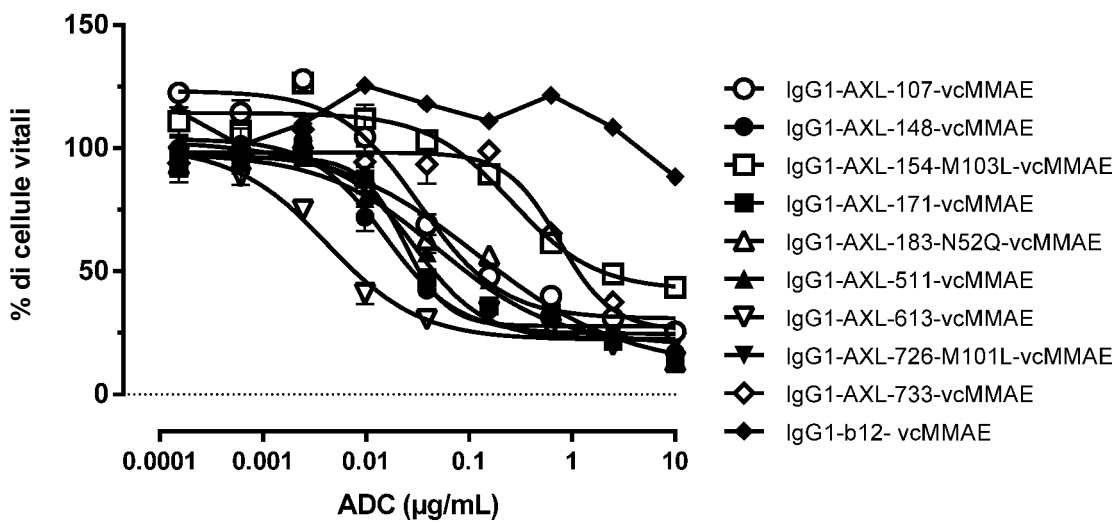
Polypio Montech

Figura 15

A

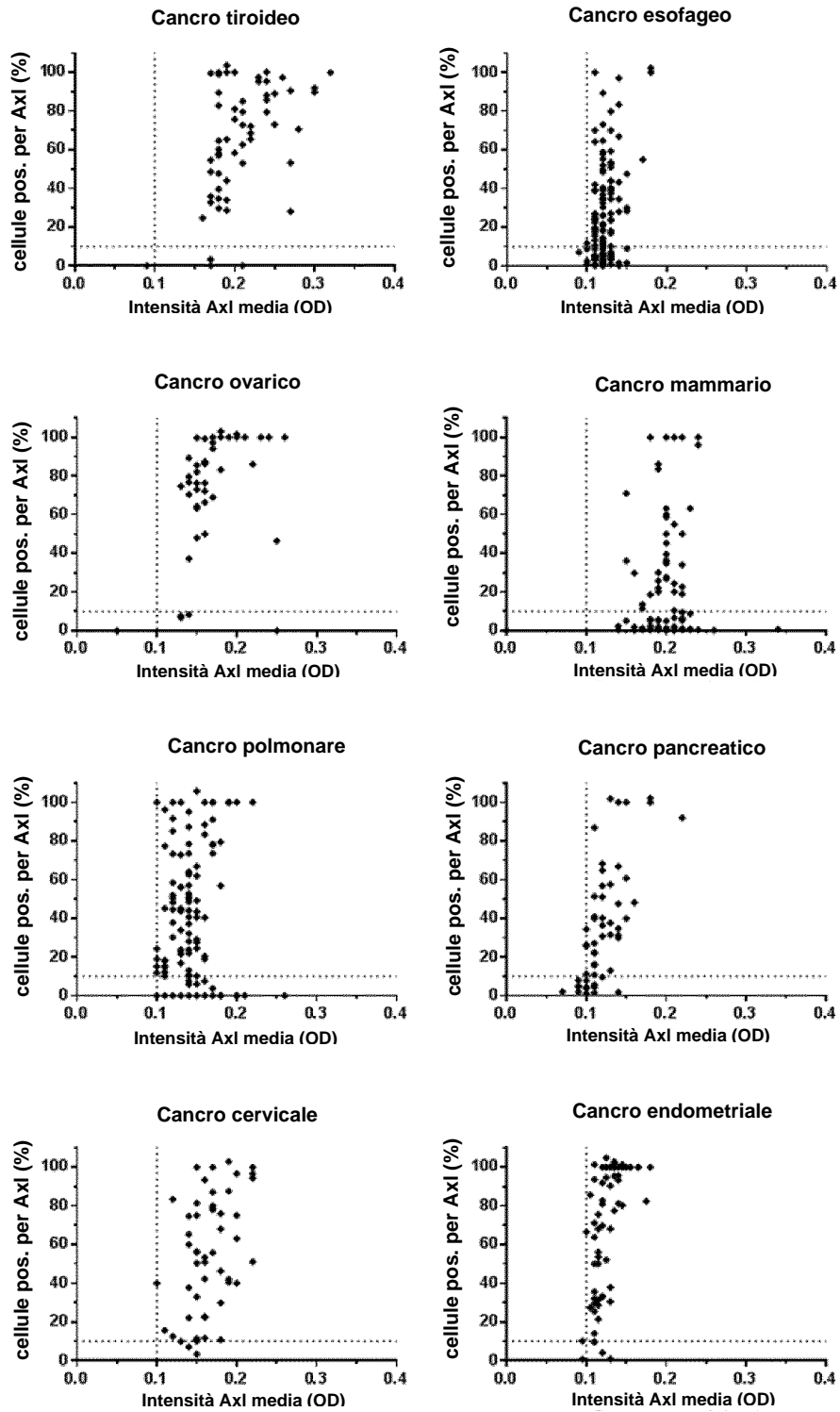


B



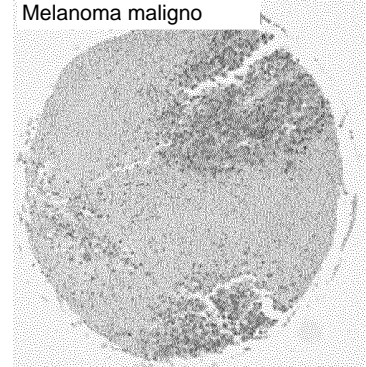
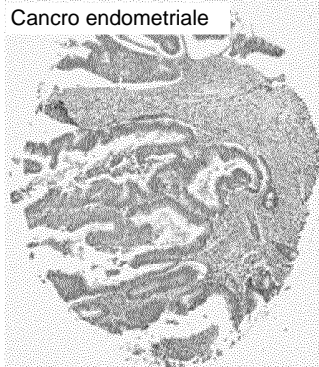
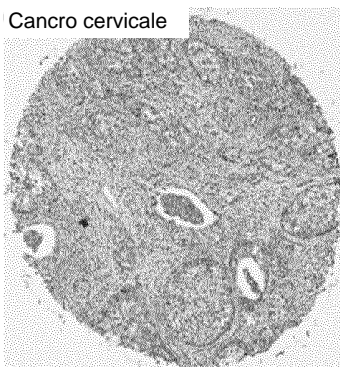
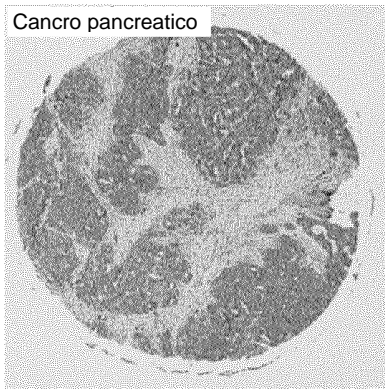
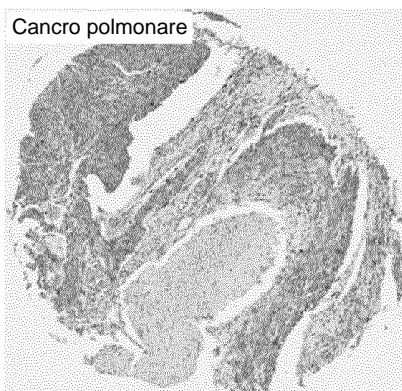
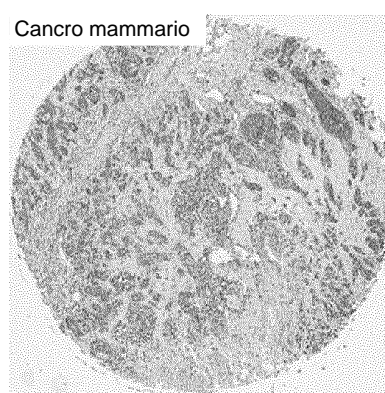
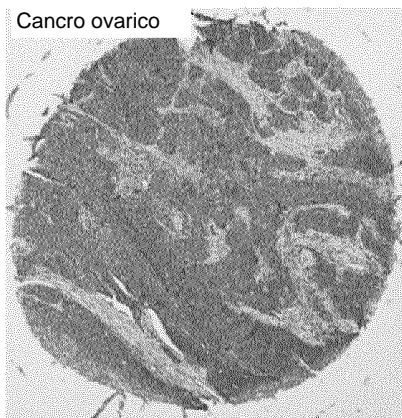
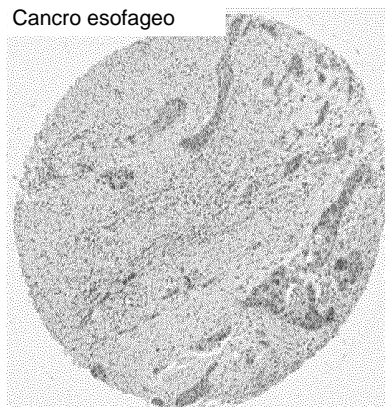
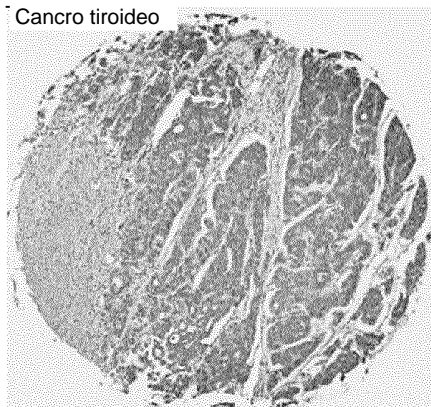
Allyo Montech

Figura 16



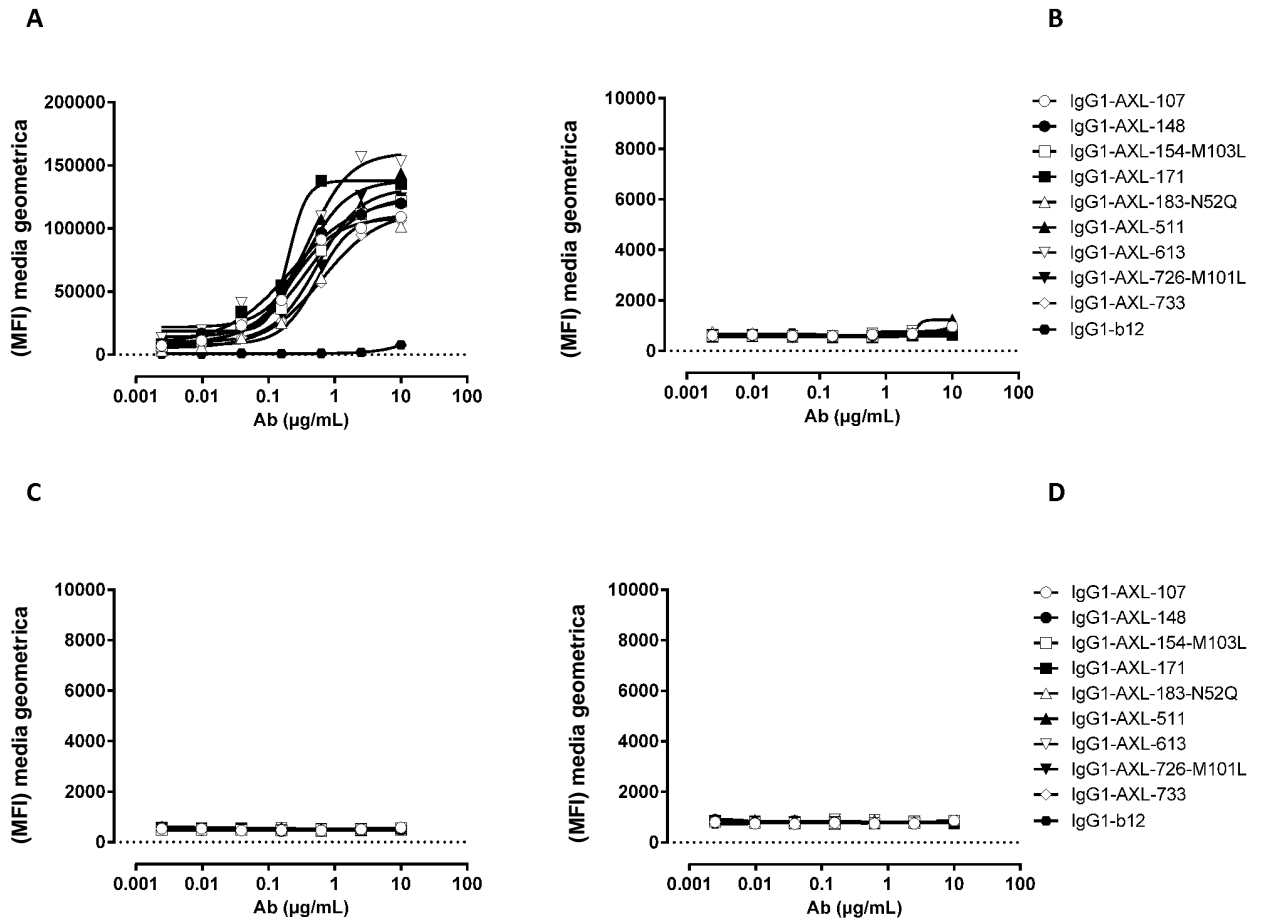
Handwritten signature in blue ink, possibly reading "Martyo Montech".

Figura 17



Allyp Moatch

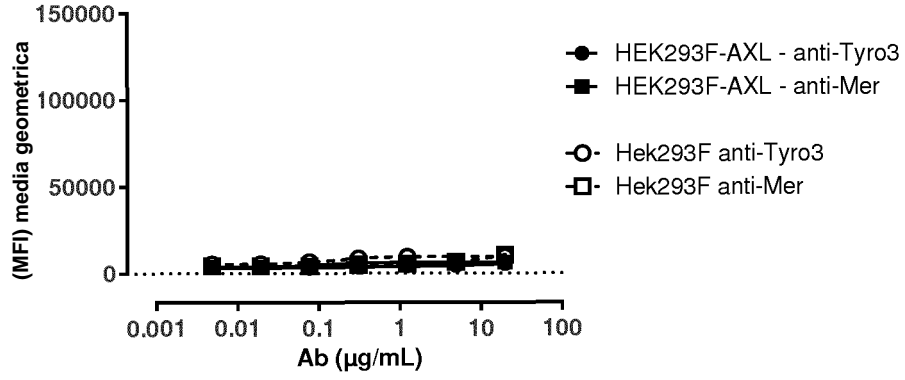
Figura 18



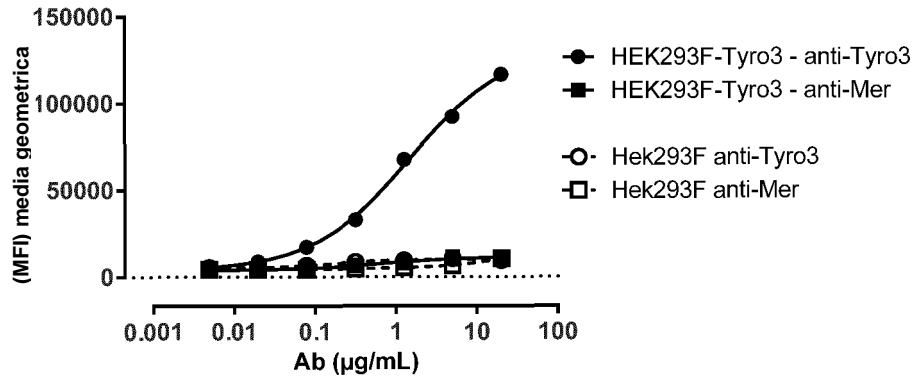
Polypo Montech

Figura 18 (continuata)

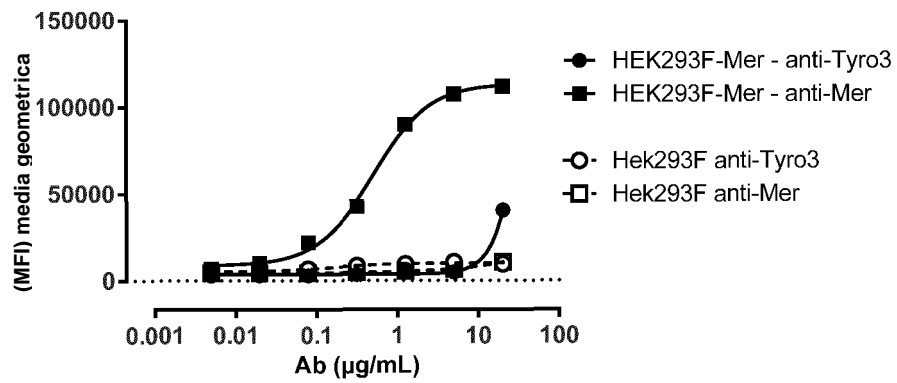
E



F

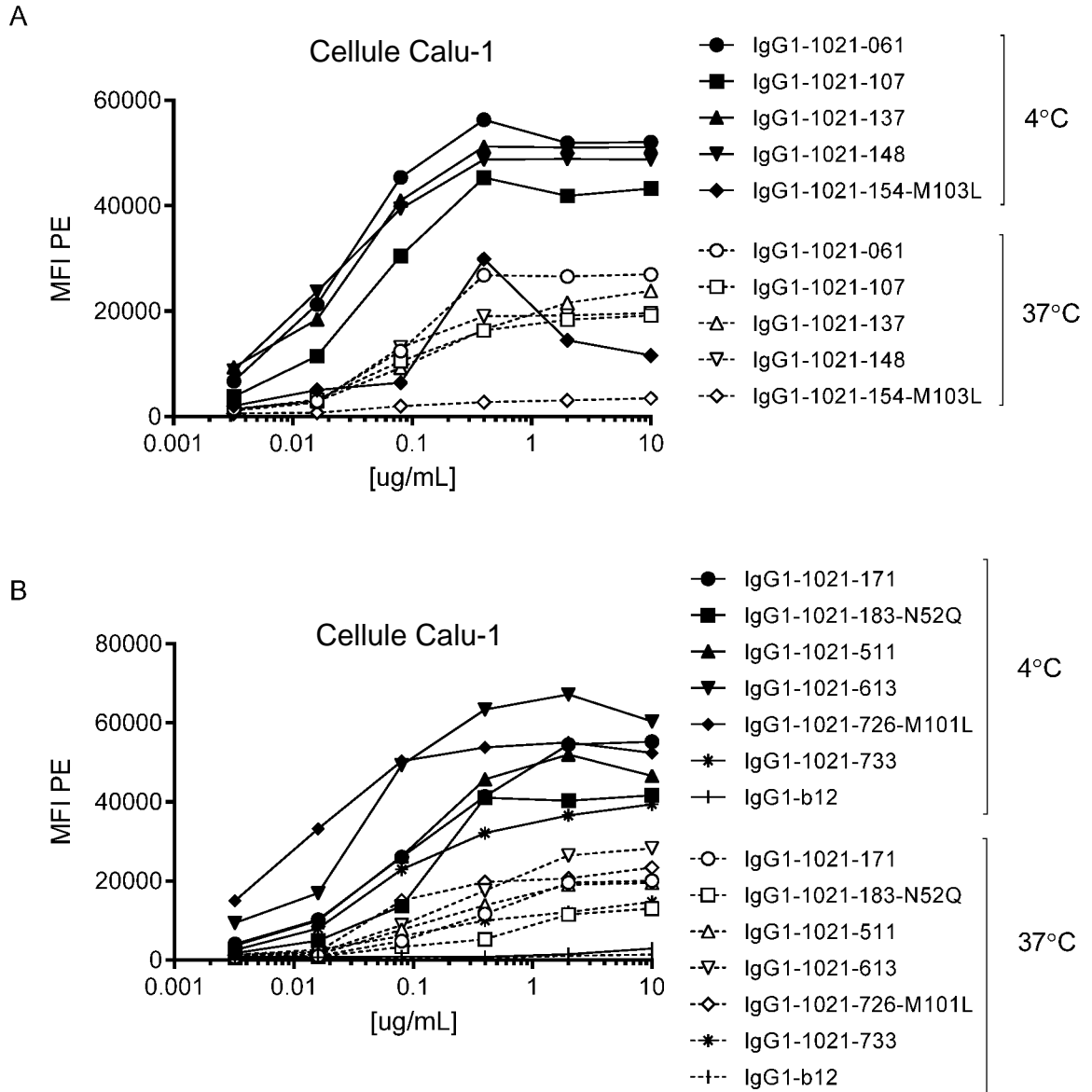


G



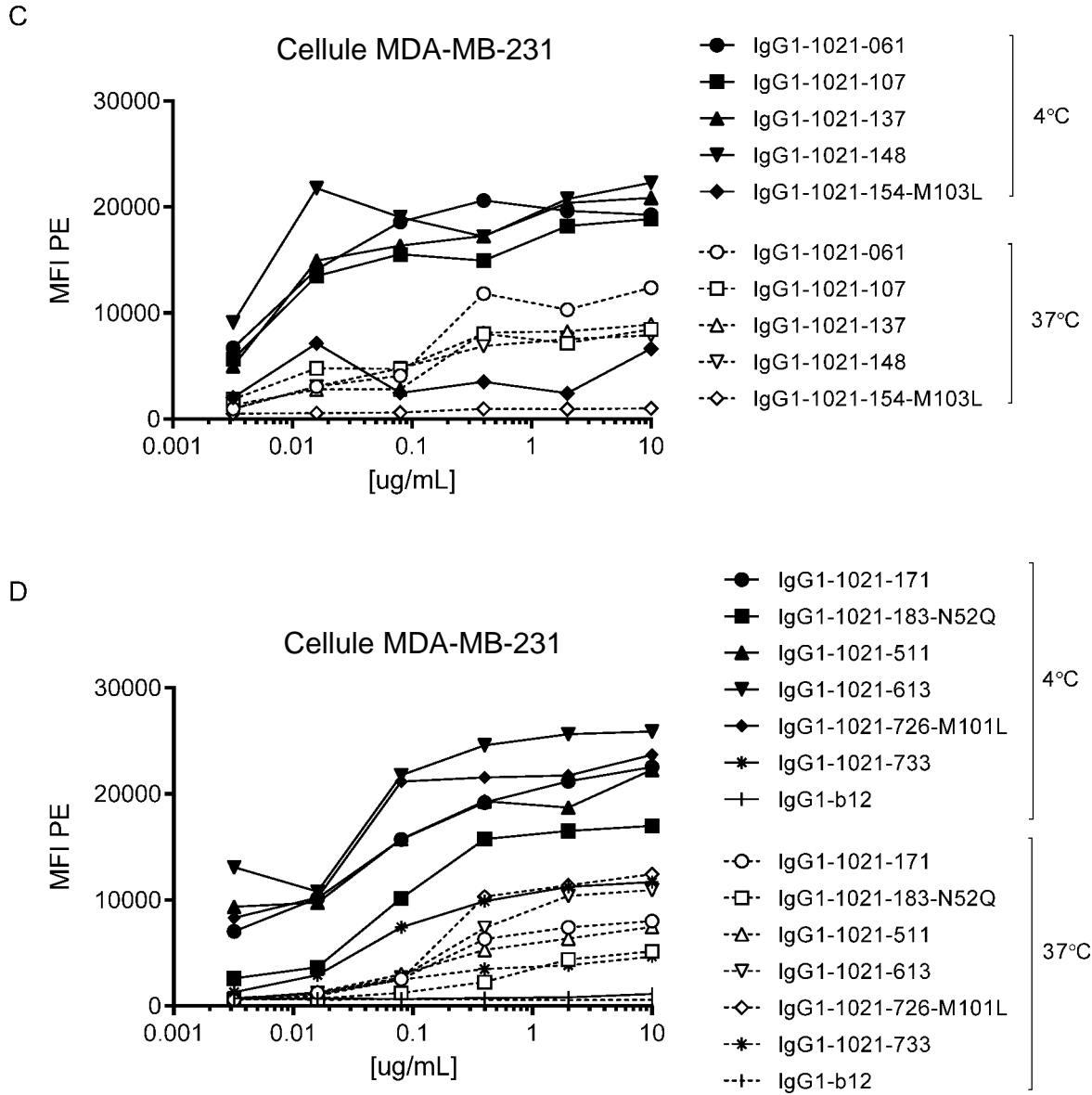
Mylo Montel

Figura 19



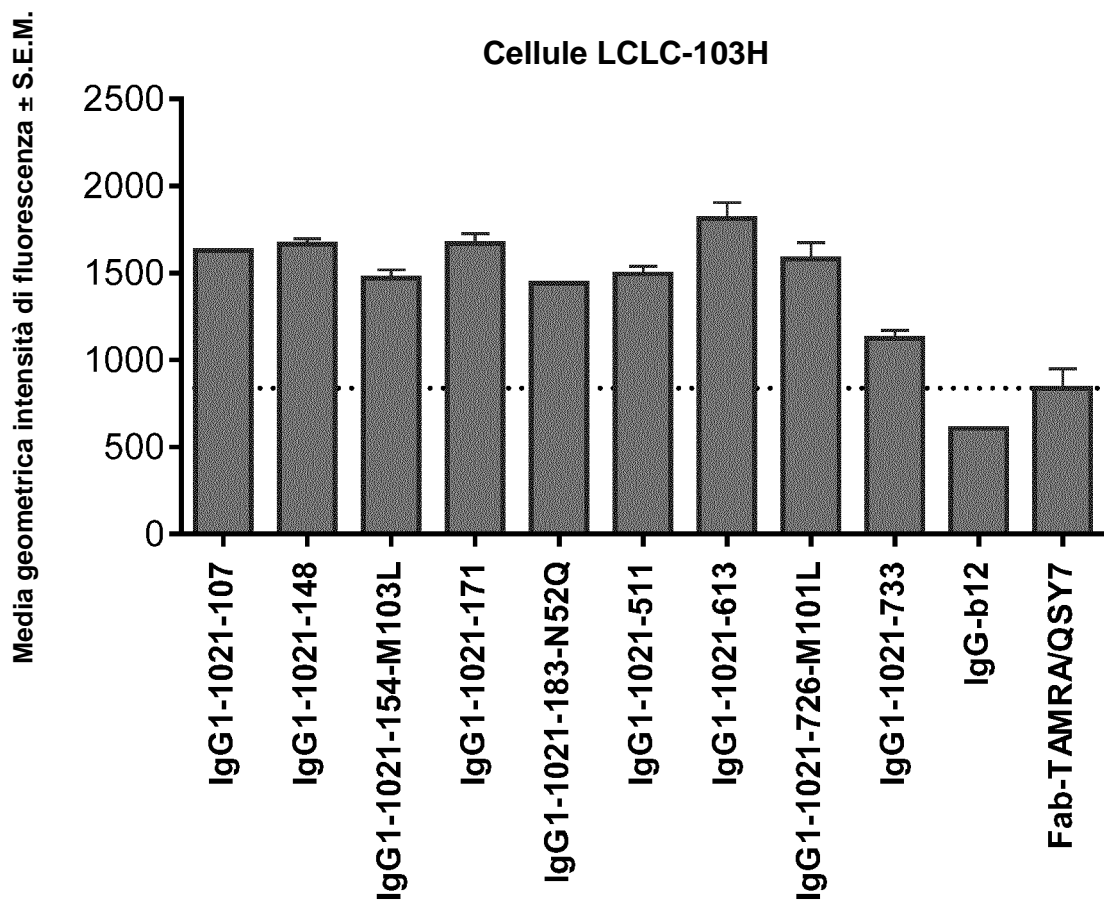
Polyplo Montech

Figura 19 (continuata)



Polyo Montech

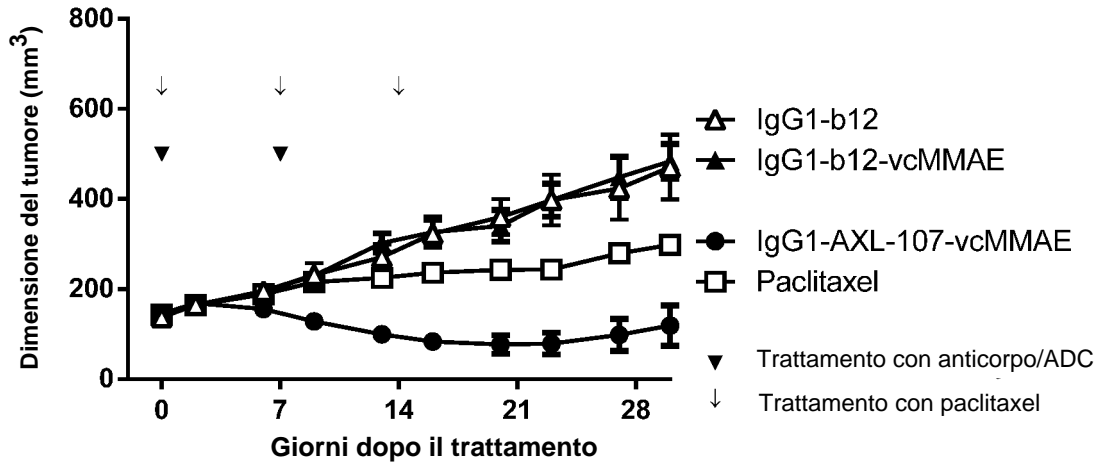
Figura 20



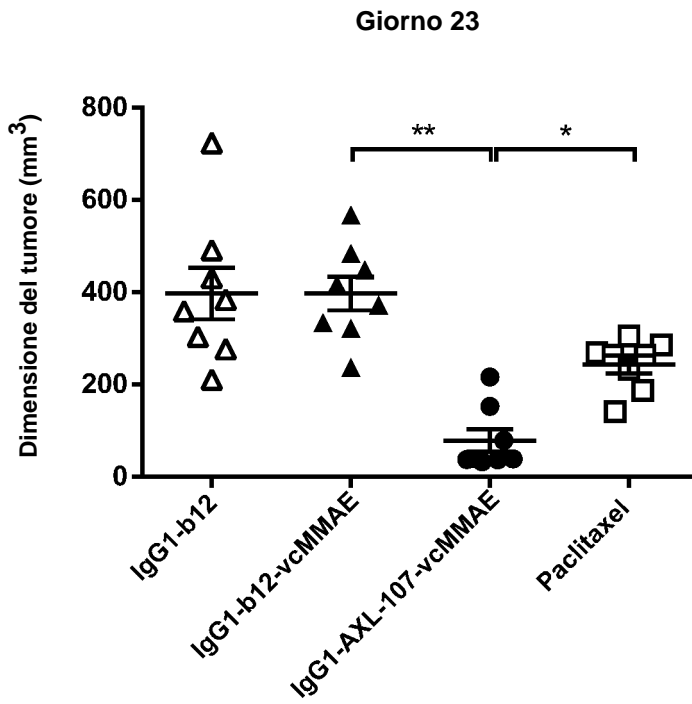
Polyp Montech

Figura 21

A



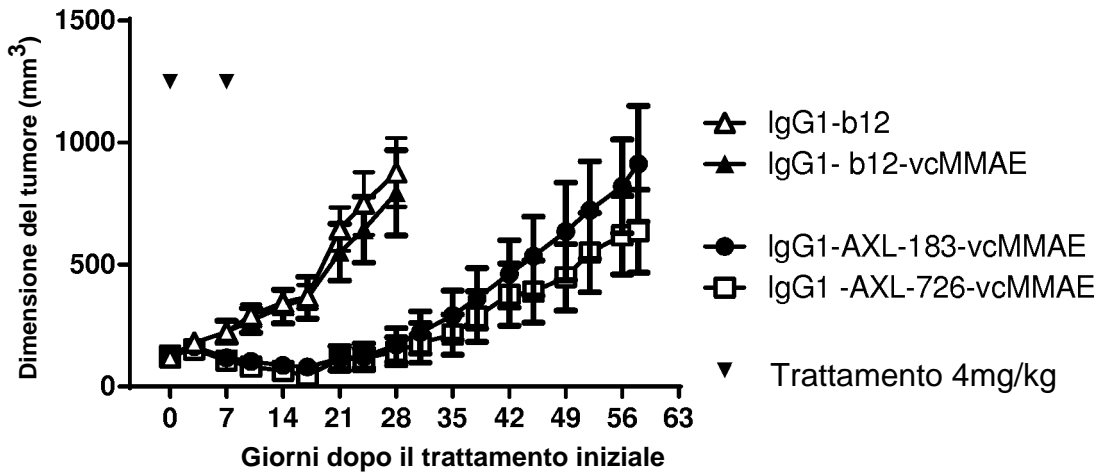
B



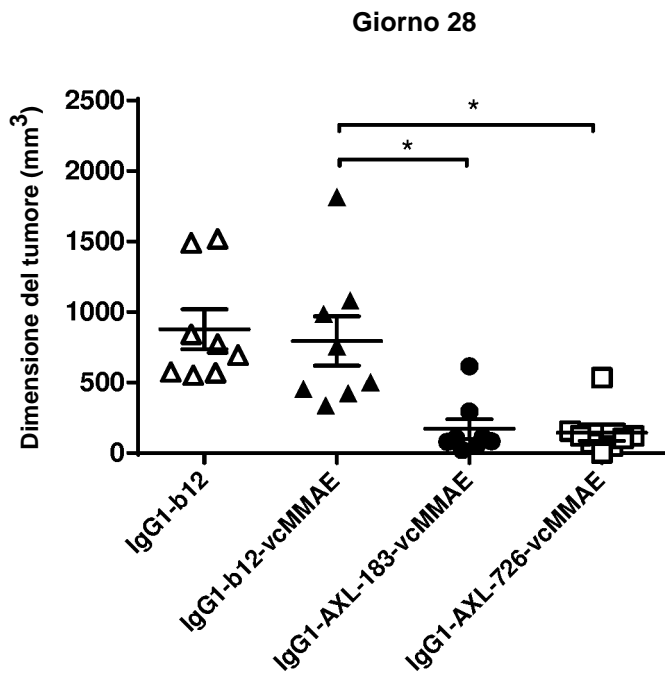
Polypo Montech

Figura 22

A



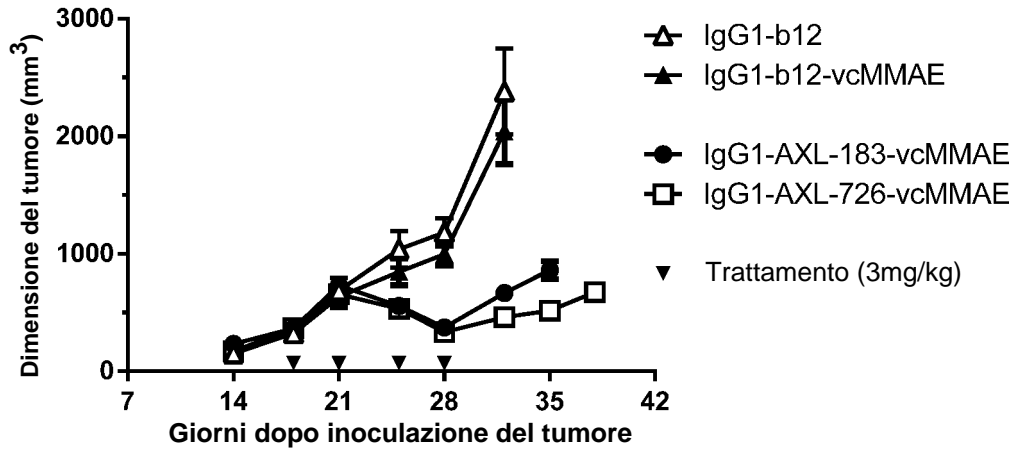
B



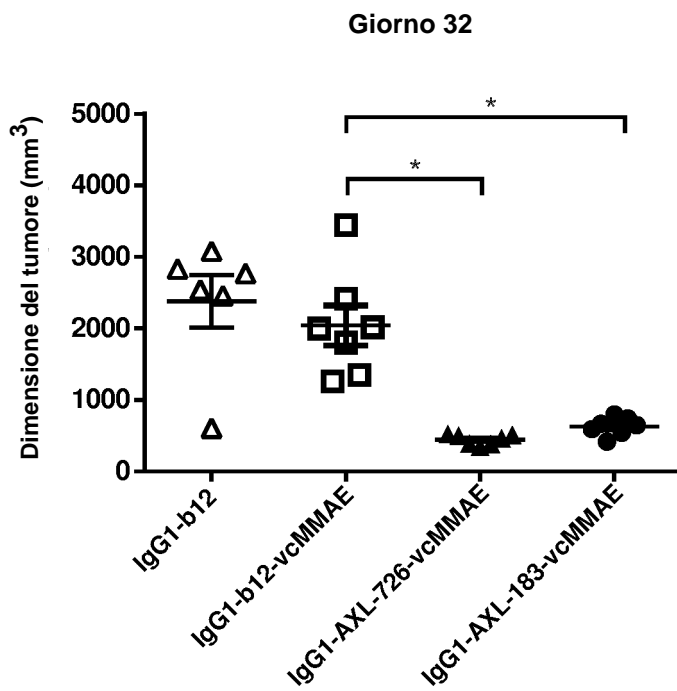
Polypo Montech

Figura 23

A

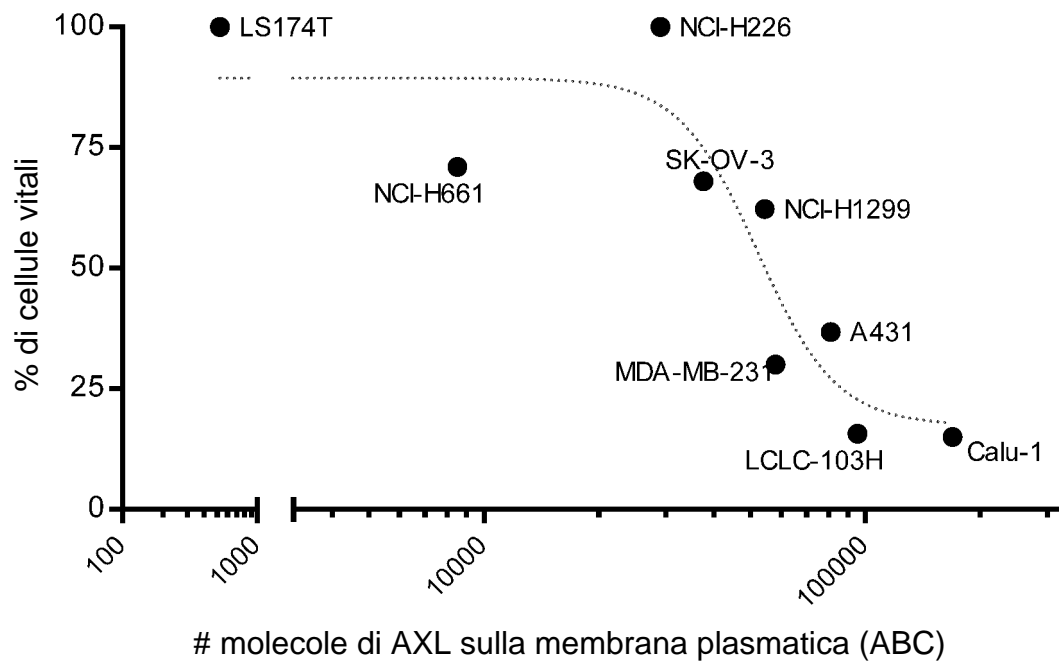


B



Polypio Montech

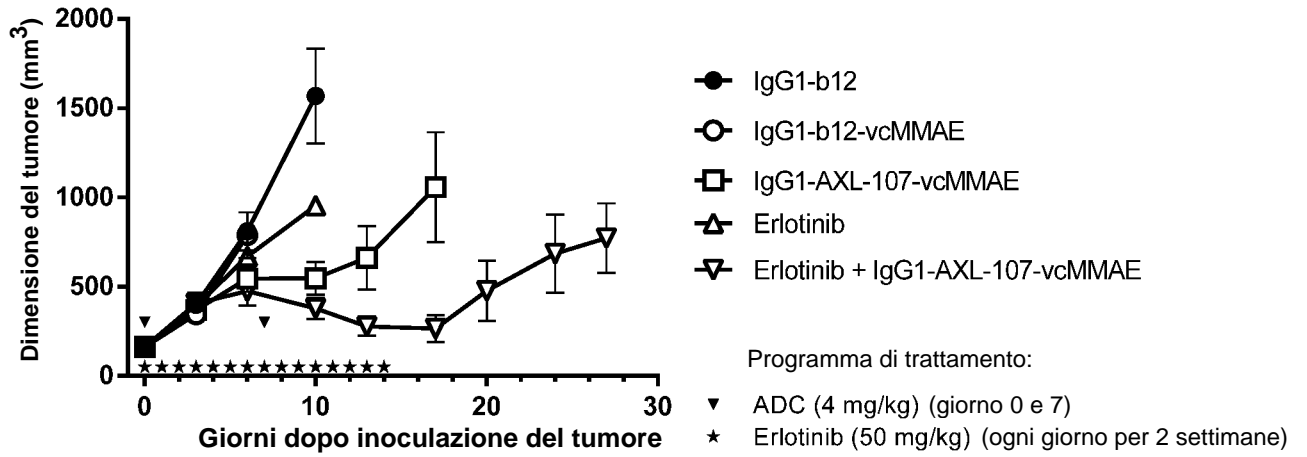
Figura 24



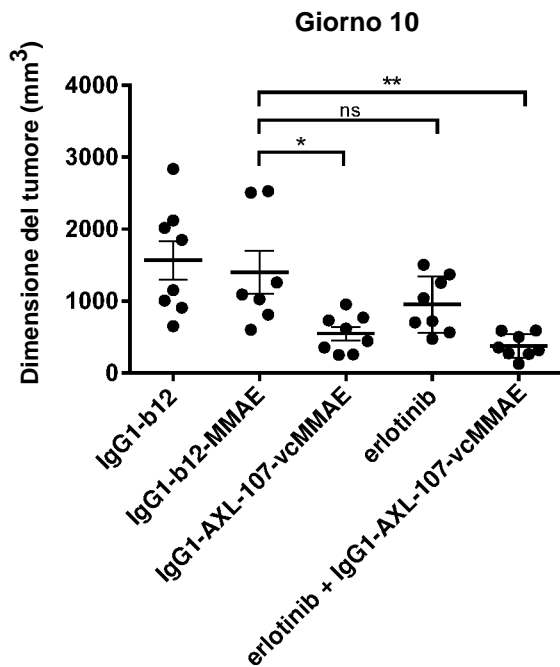
Polyp Montel

Figura 25

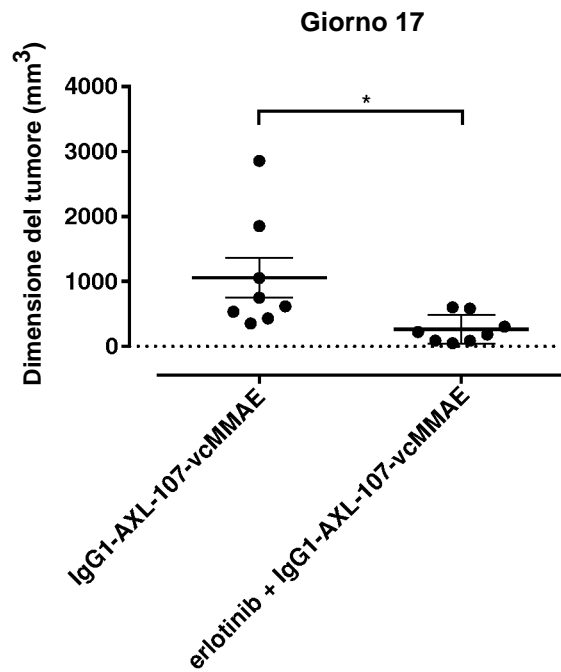
A



B



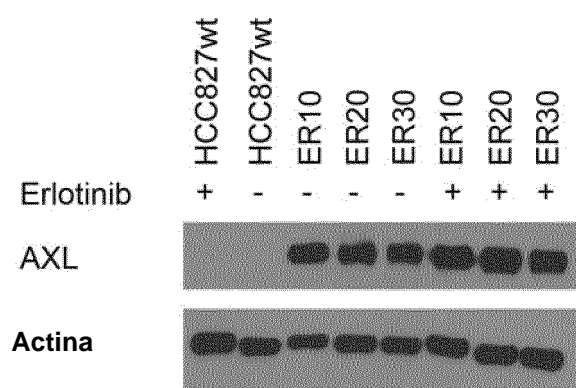
C



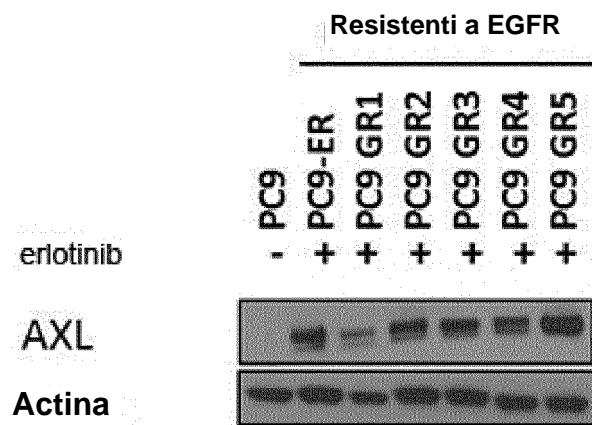
Polypa Montech

Figura 26

A.



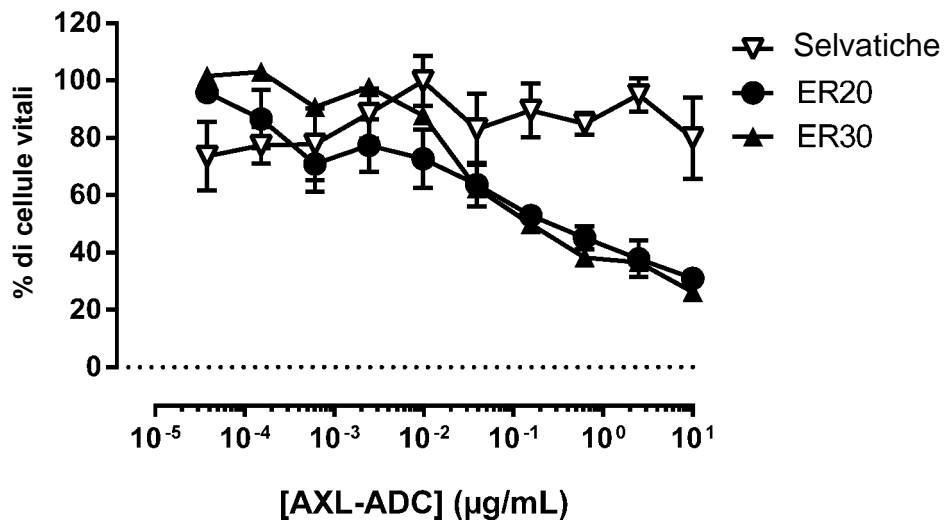
B.



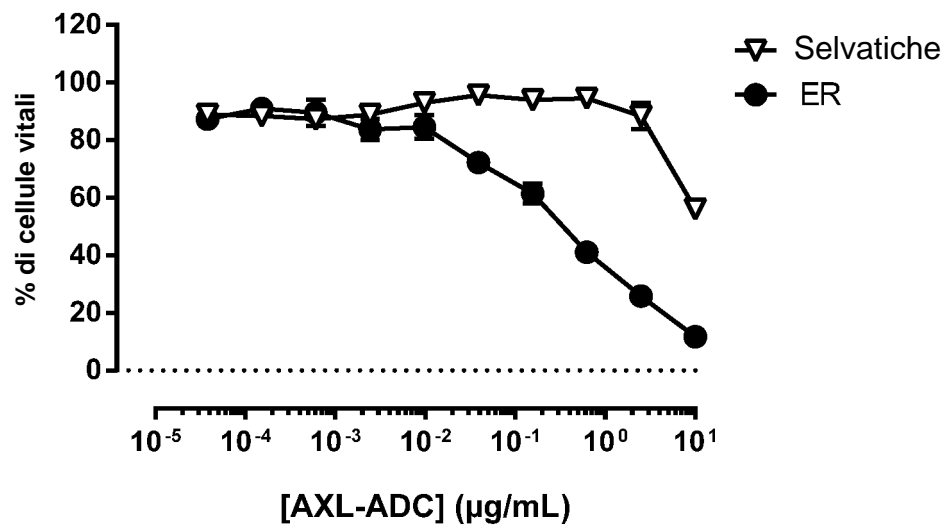
Allyo Montech

Figura 27

A. HCC827



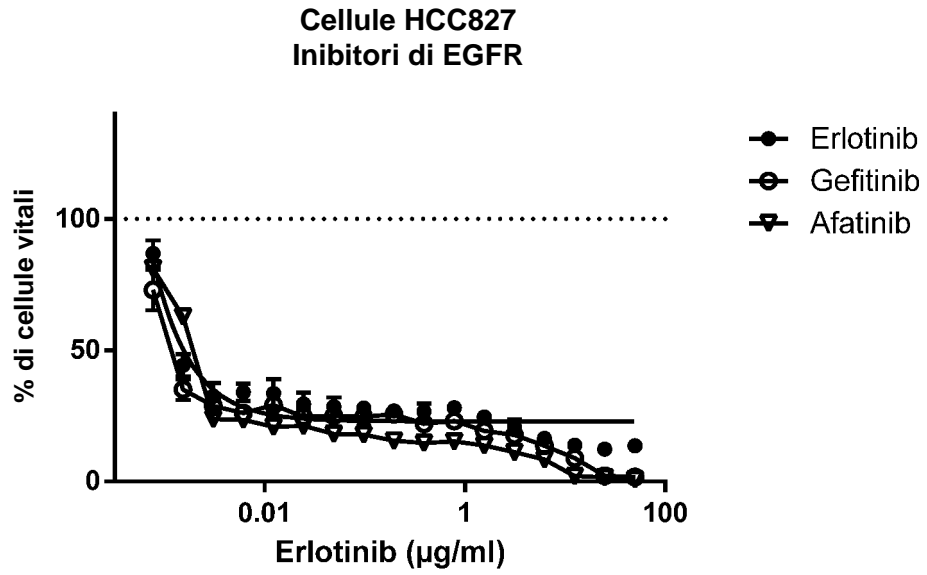
B. PC9



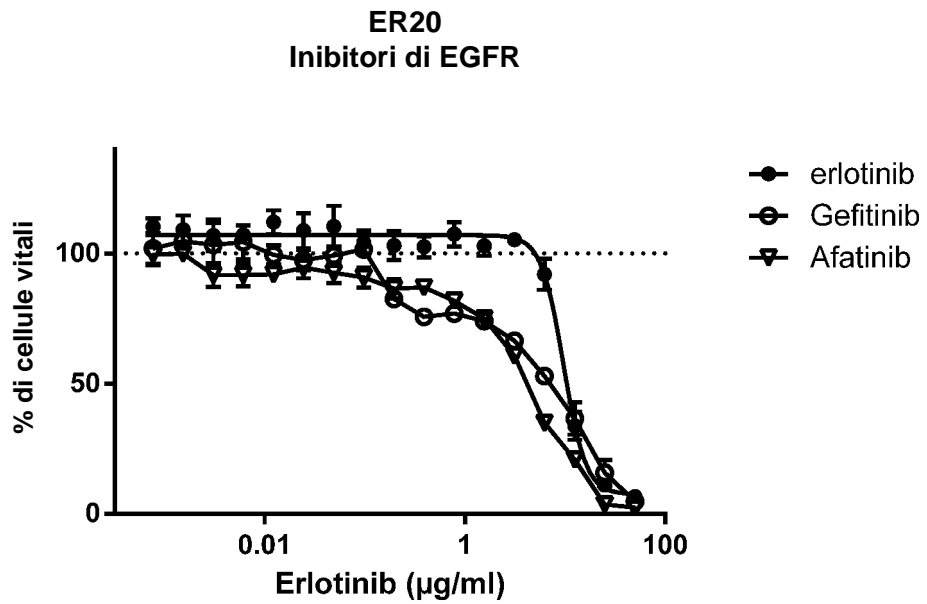
Allyo Montech

Figura 27 (continuata)

C



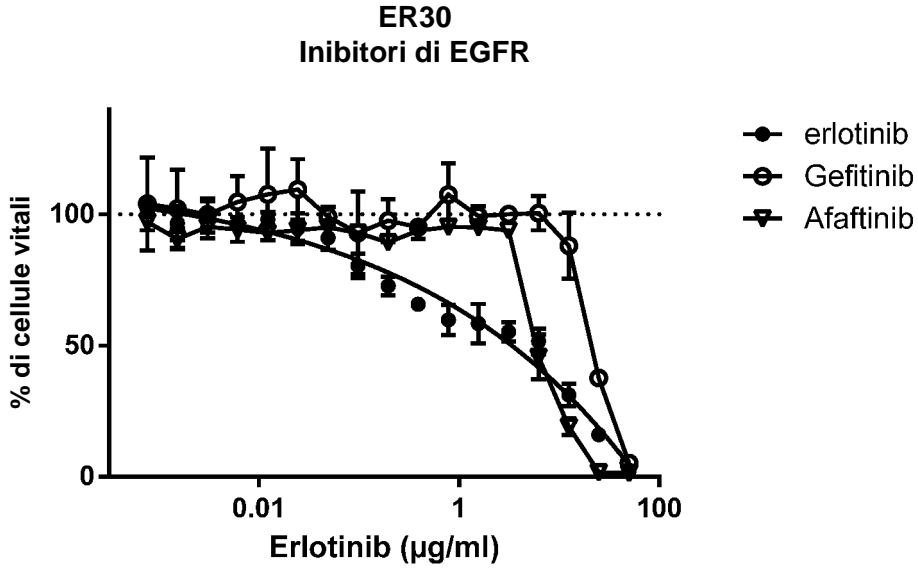
D



Polypo Montech

Figura 27 (continuata)

E



F

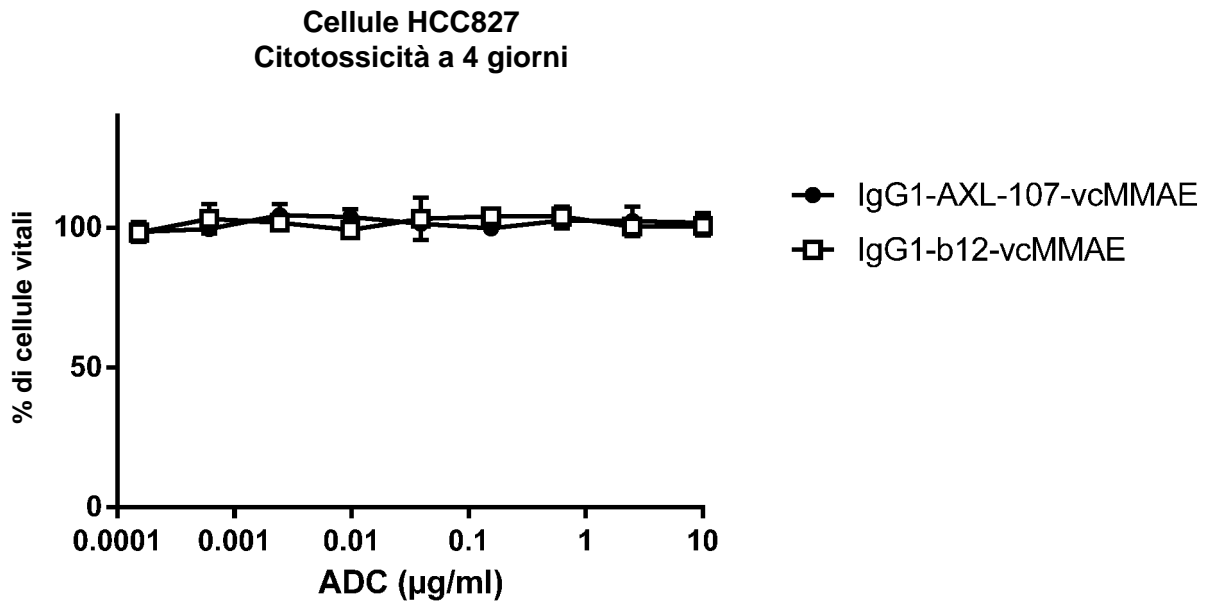
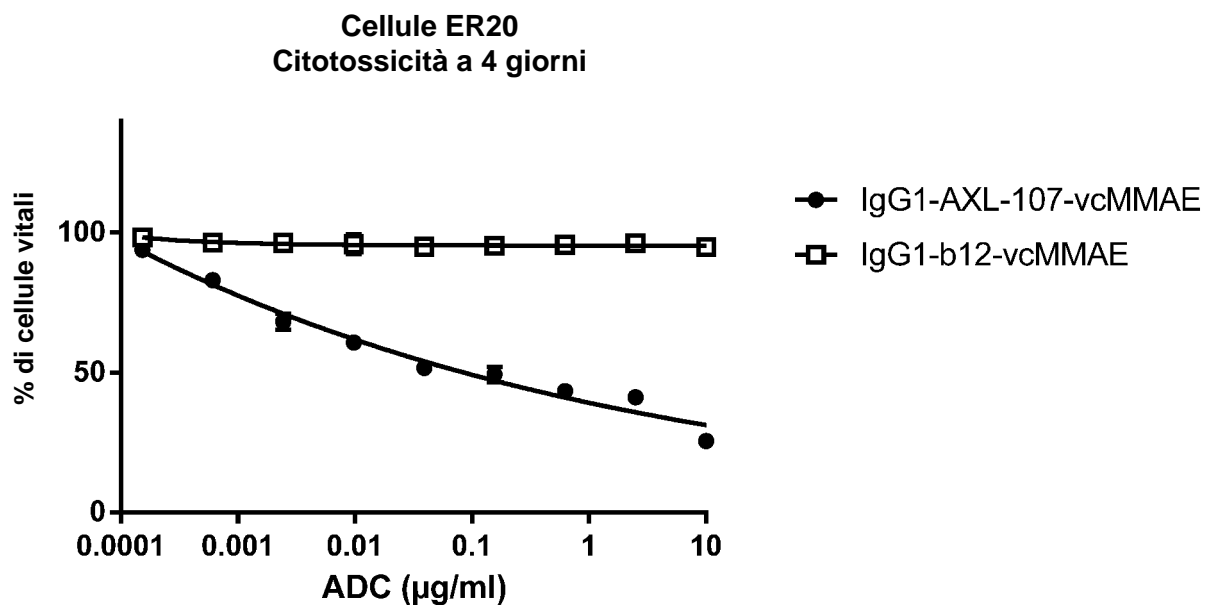
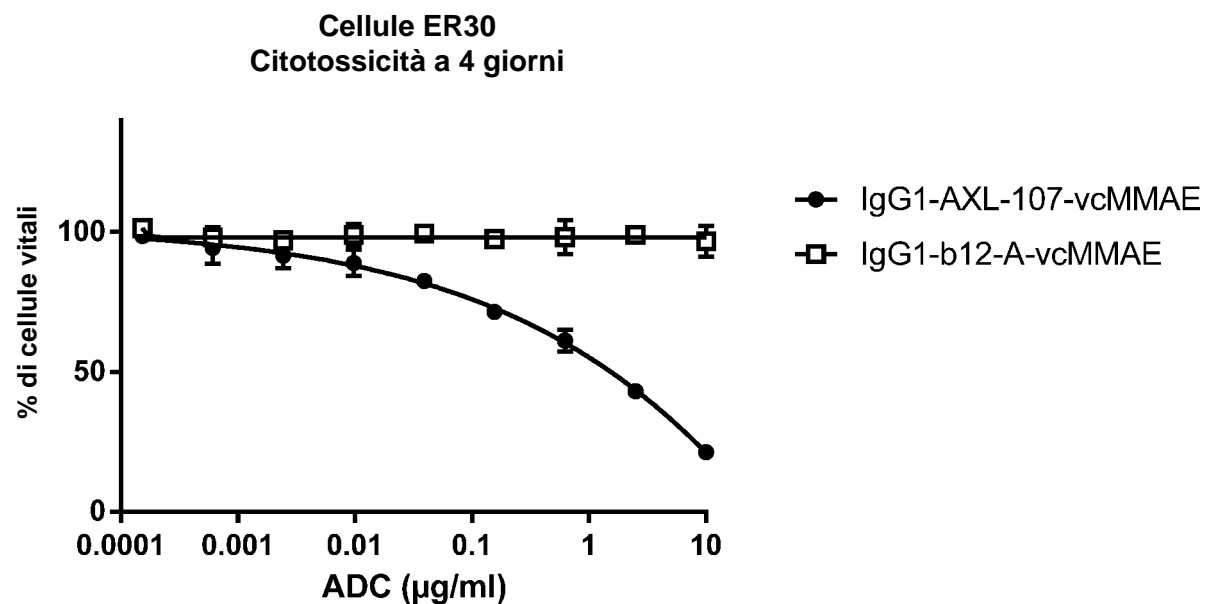


Figura 27 (continuata)

G



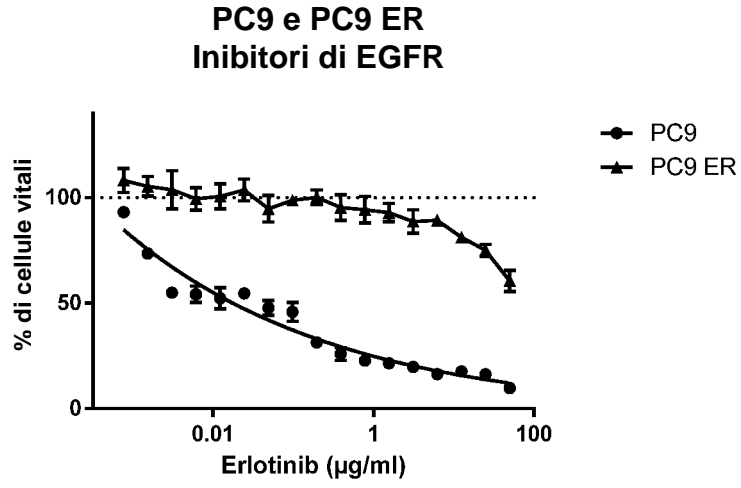
H



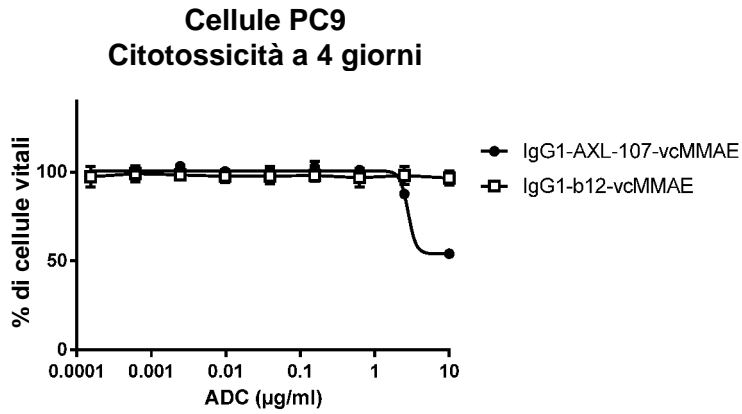
Polypa Montebelloni

Figura 27 (continuata)

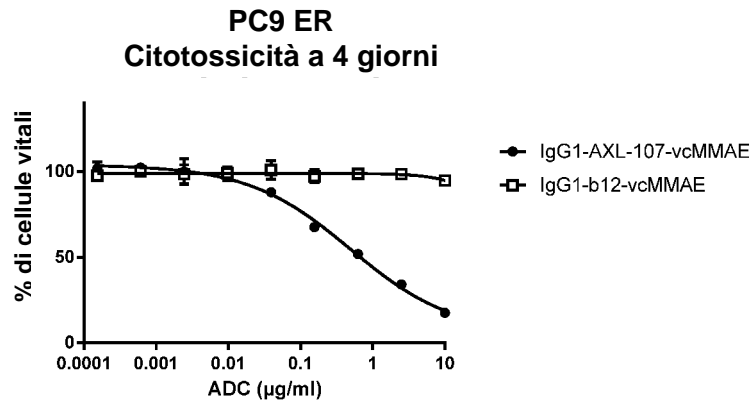
I



J



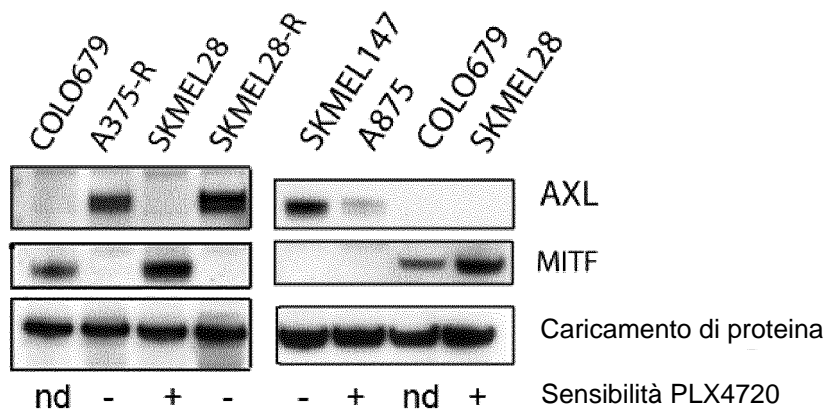
K



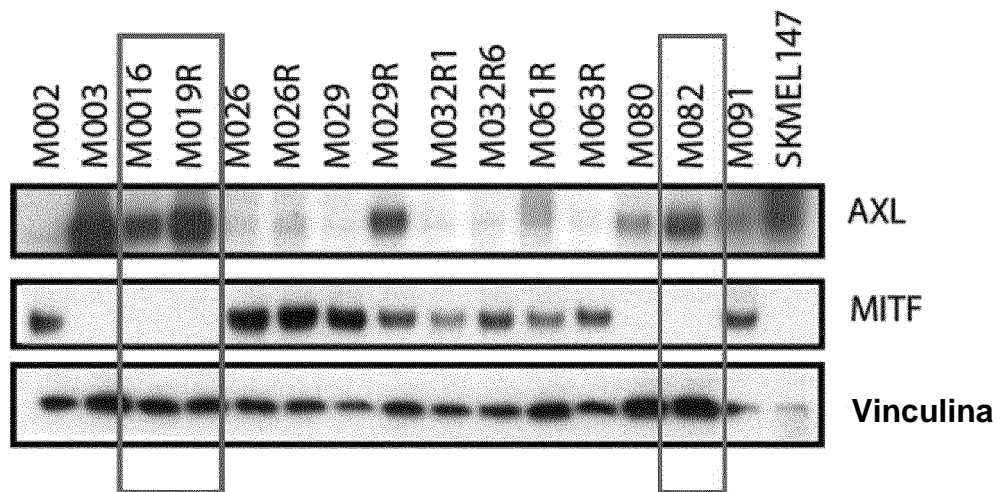
Polypa Montech

Figura 28

A

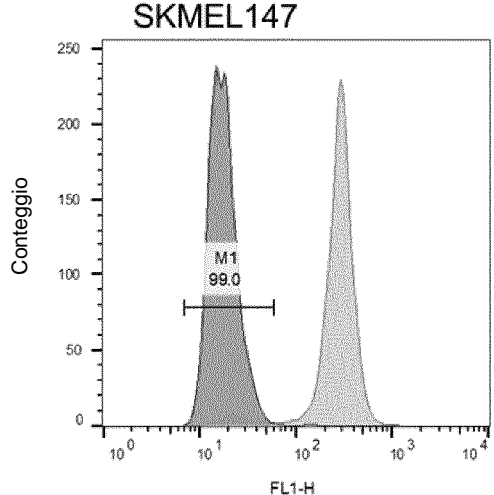
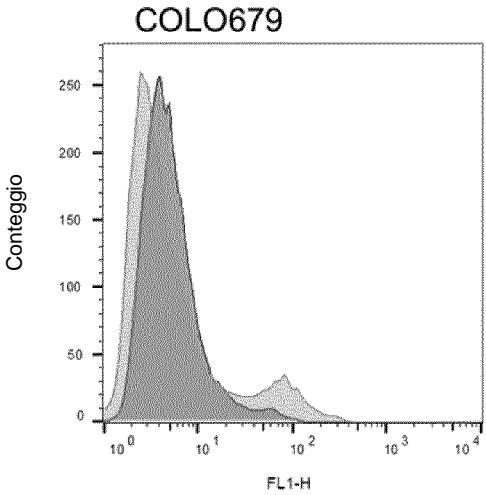


B



Allyo Montech

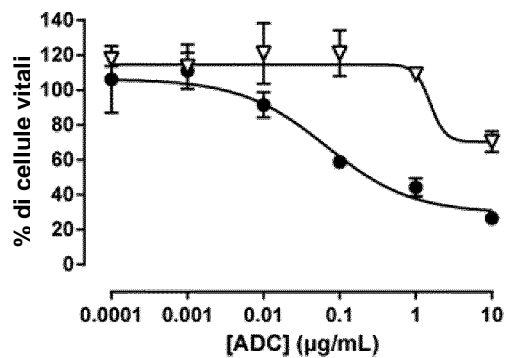
Figura 29



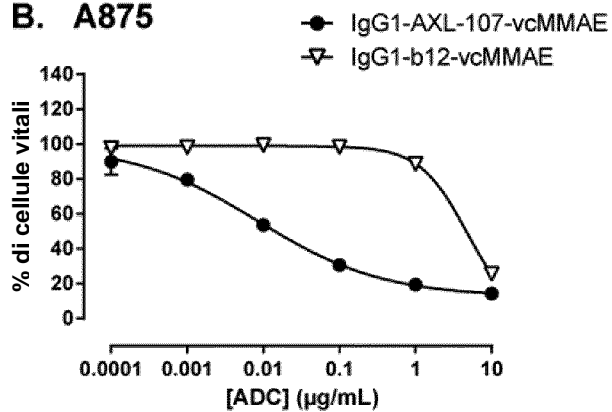
Poligo Montebelluna

Figura 30

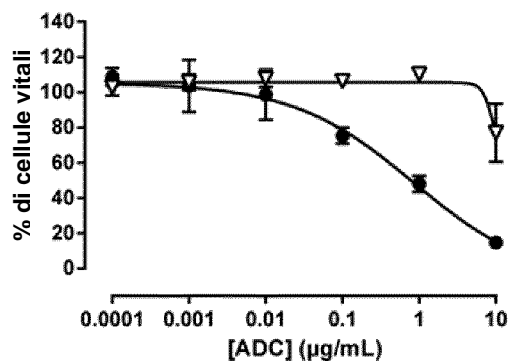
A. SKMEL147



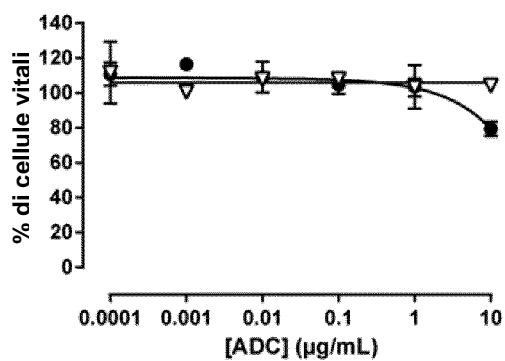
B. A875



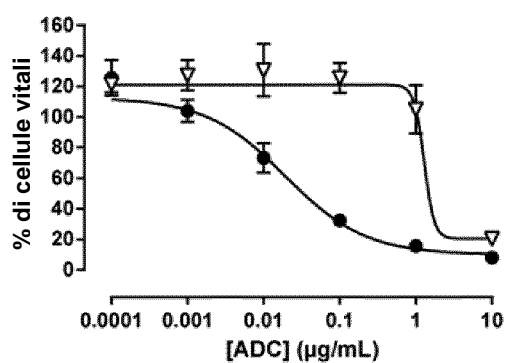
C. A375-R



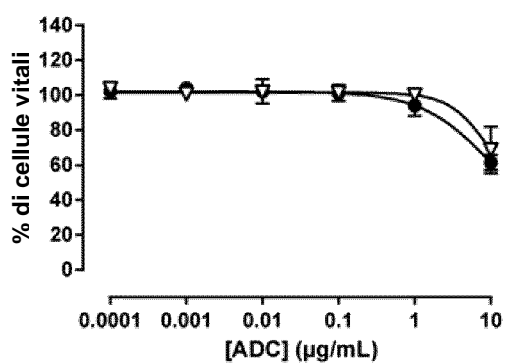
D. COLO679



E. SKMEL28-R

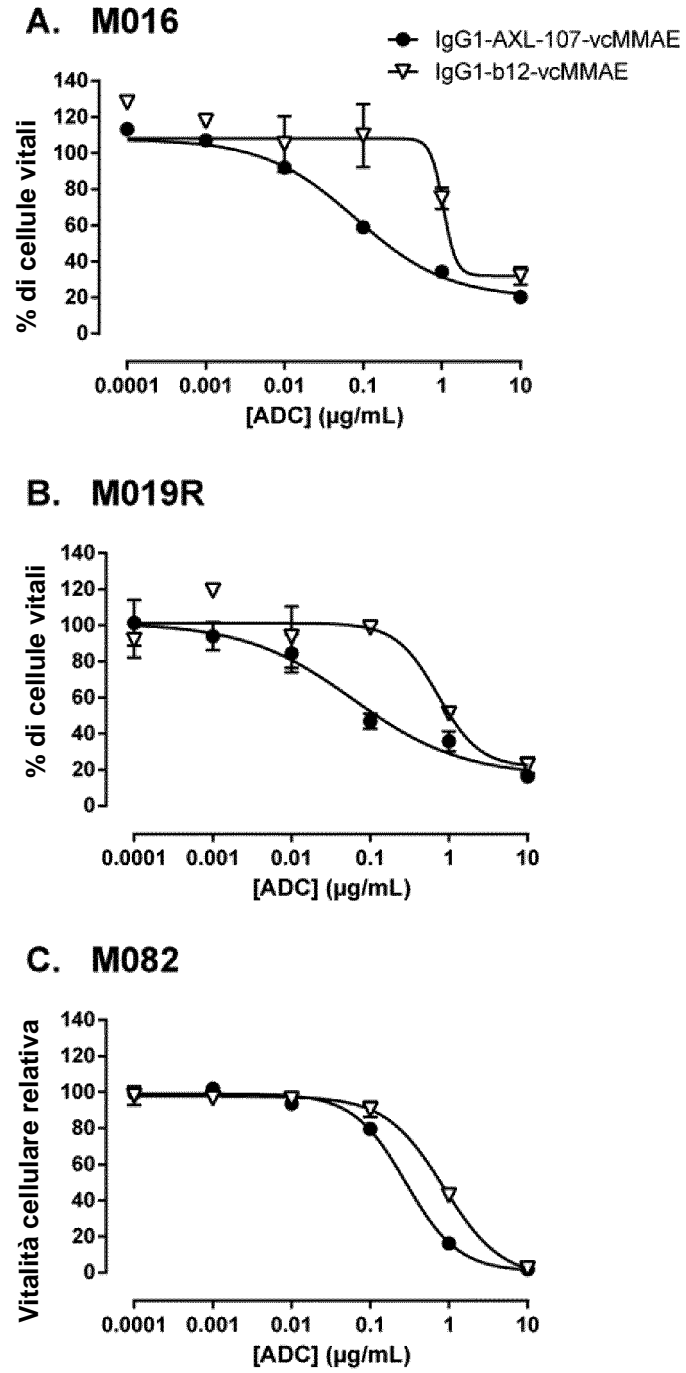


F. SKMEL28



Mylo Montel

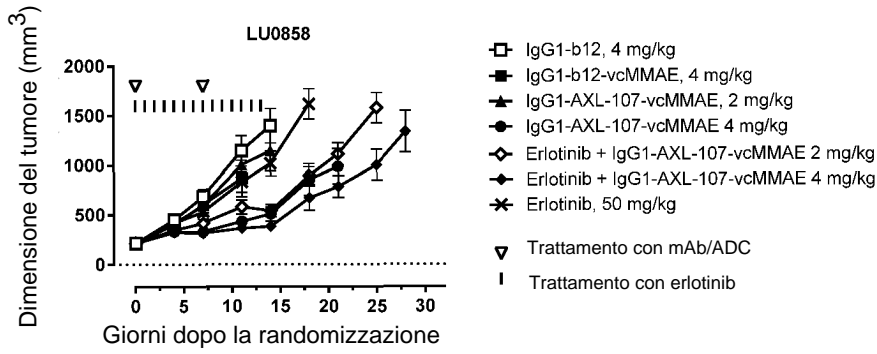
Figura 31



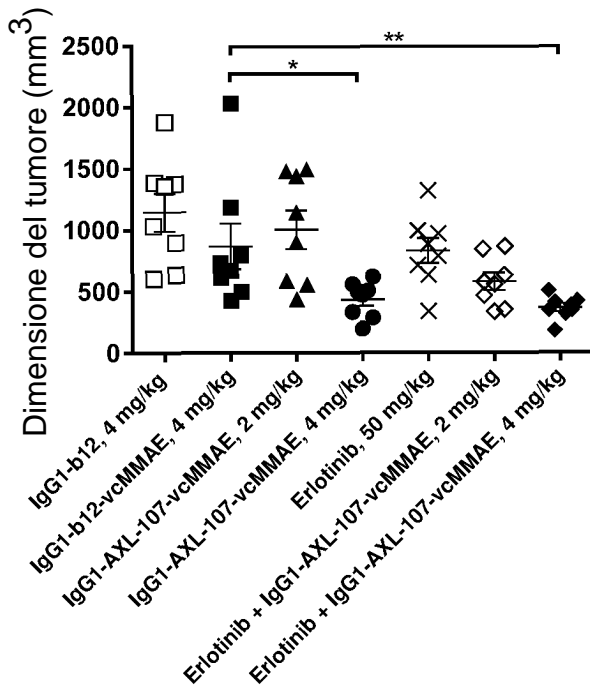
Polypa Montech

Figura 32

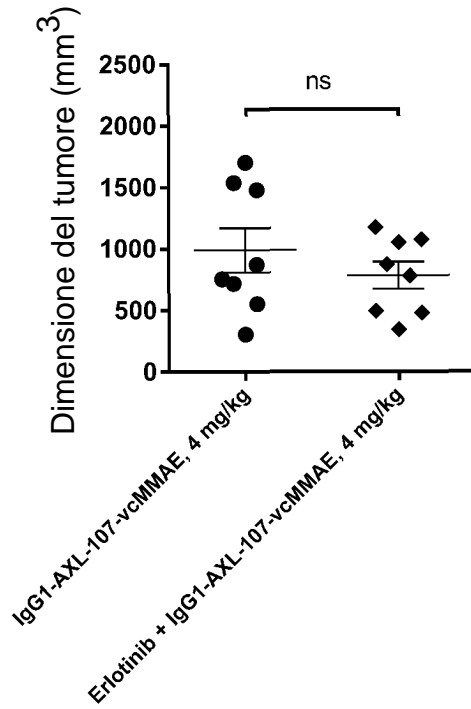
A



B



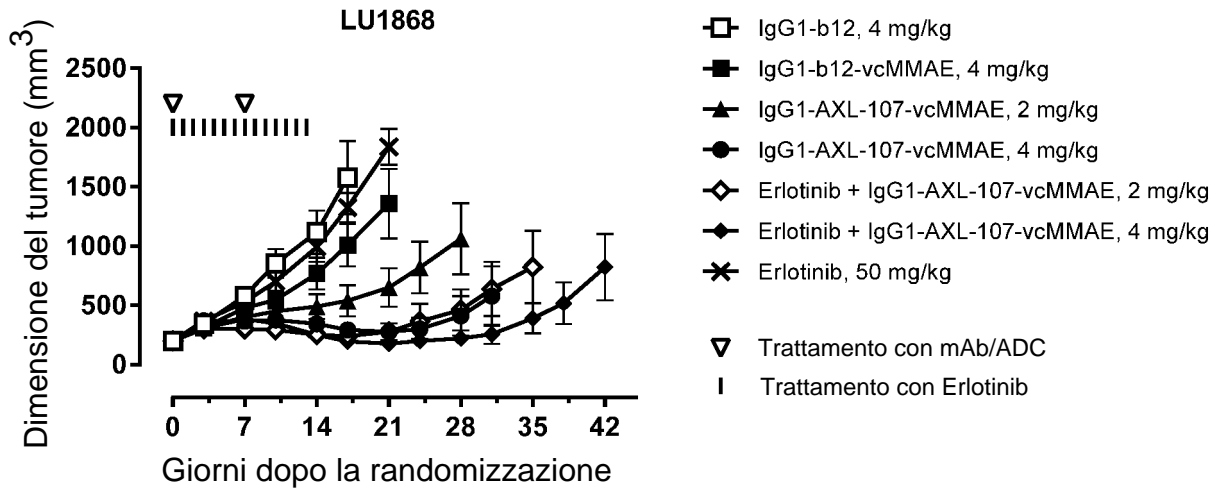
C



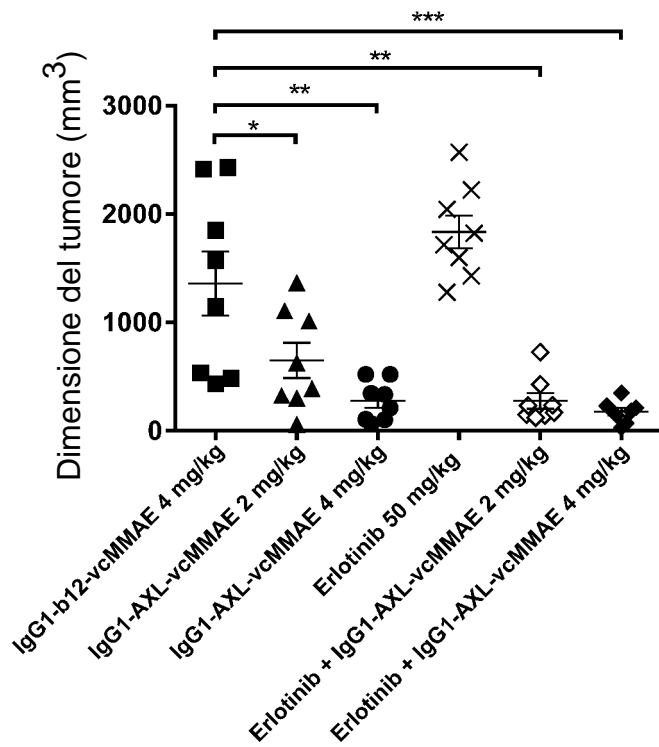
Polypo Montech

Figura 33

A

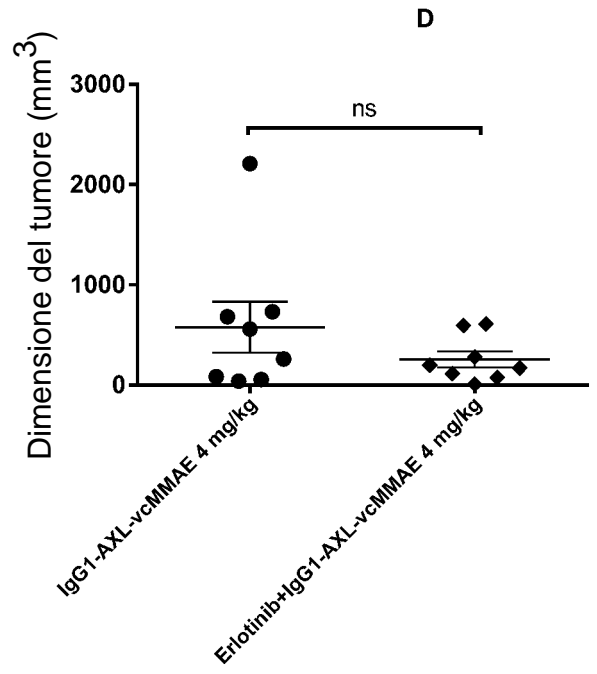
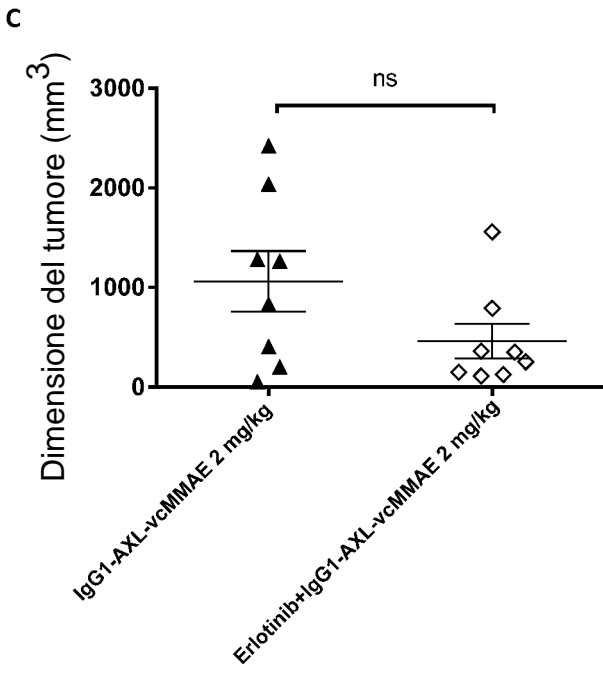


B



Poligo Montebelluna

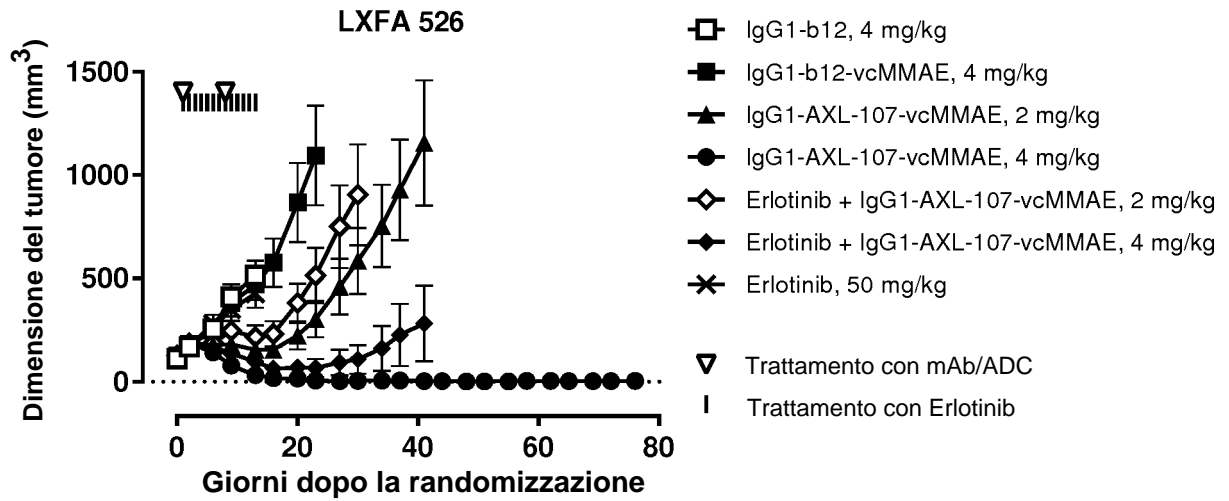
Figura 33 (continuata)



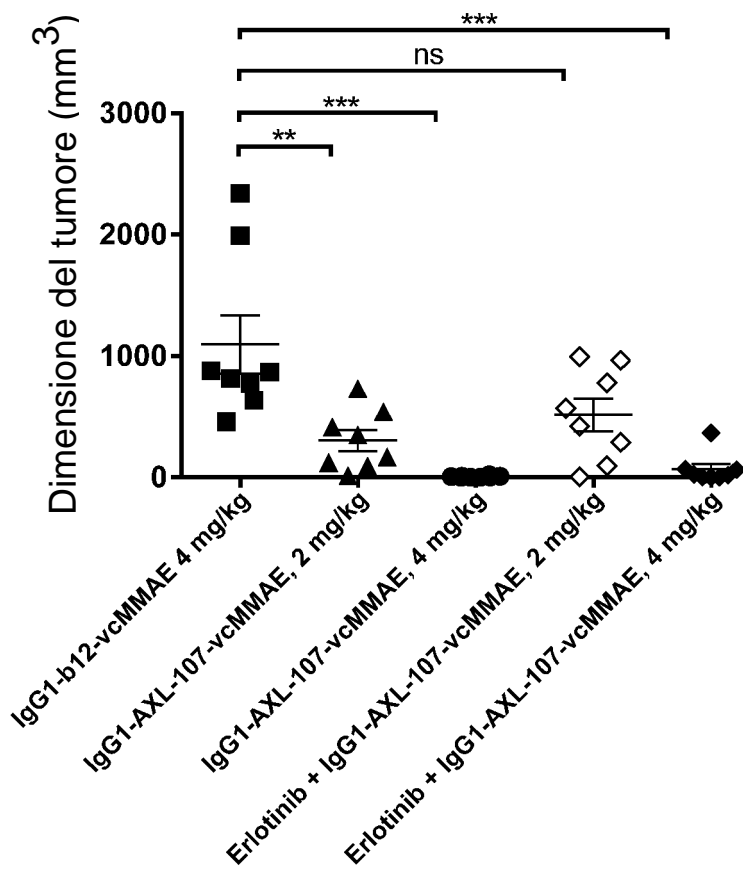
Polypio Montech

Figura 34

A



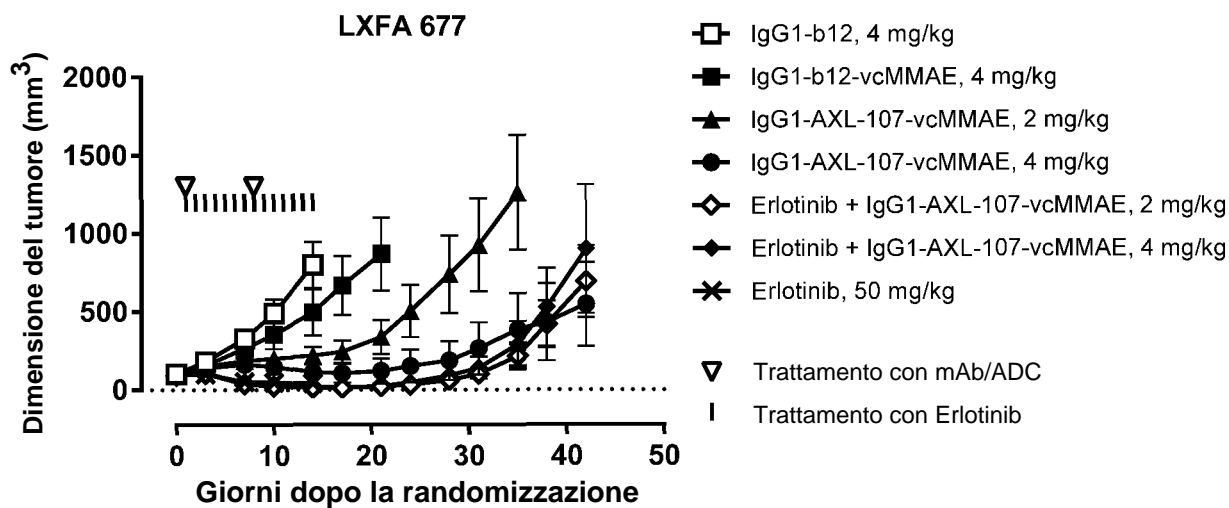
B



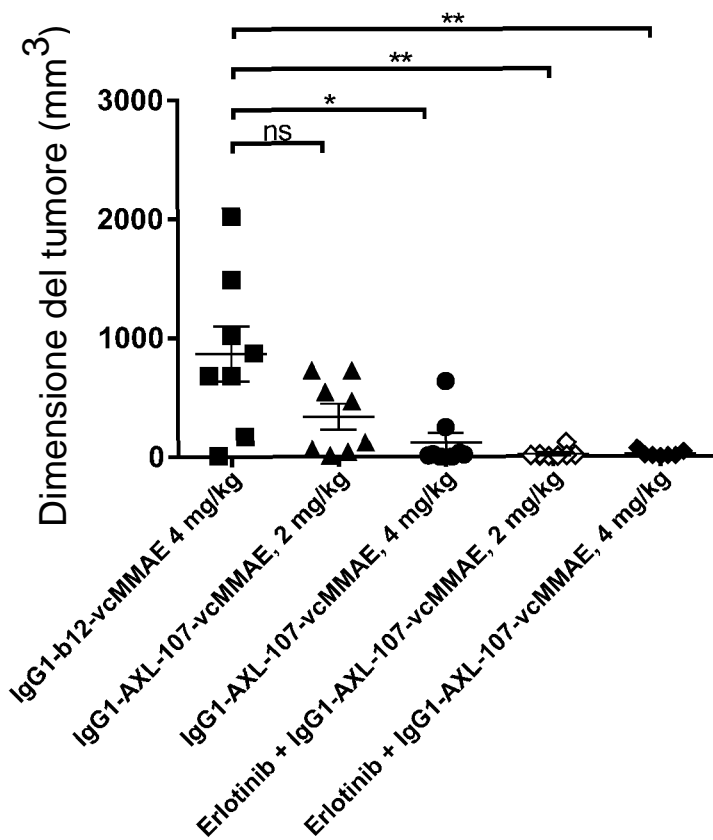
Polypa Montebelloni

Figura 35

A



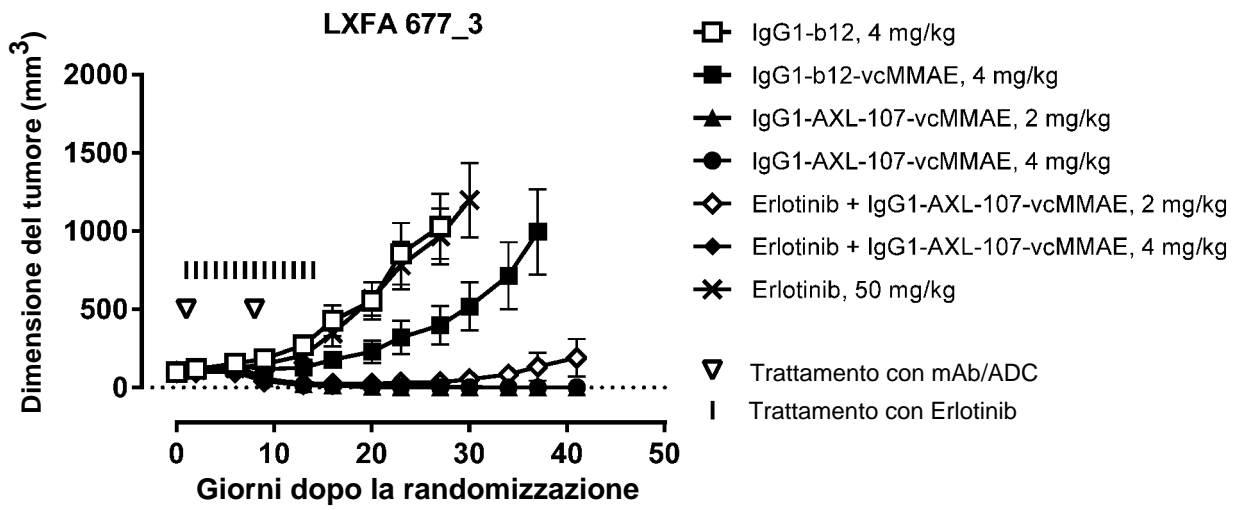
B



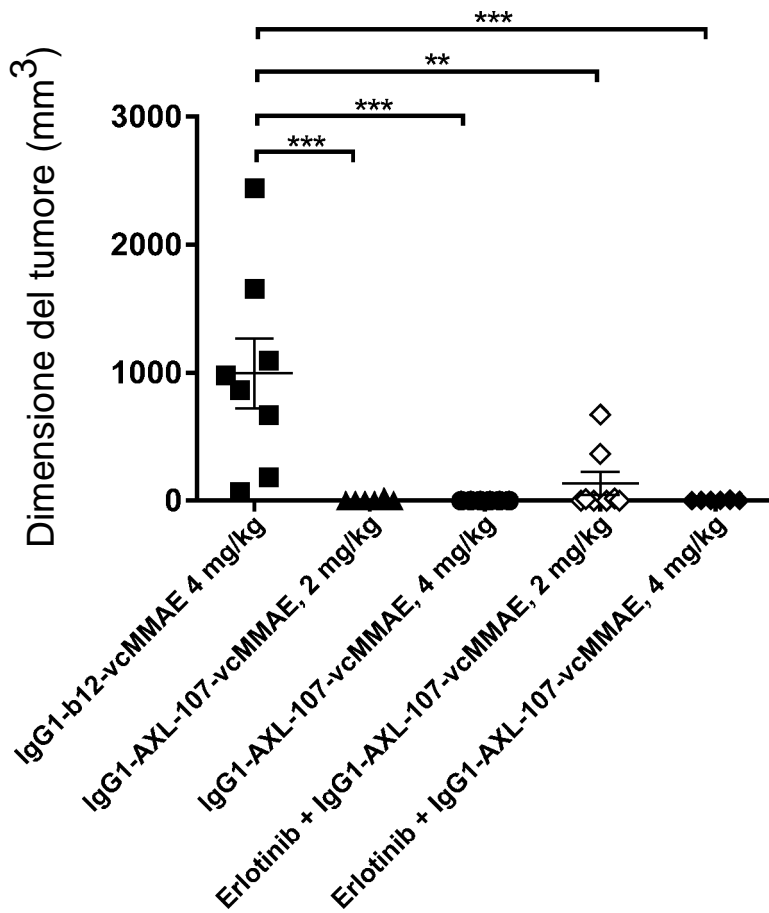
Polyp Montebelloni

Figura 35 (continuata)

C



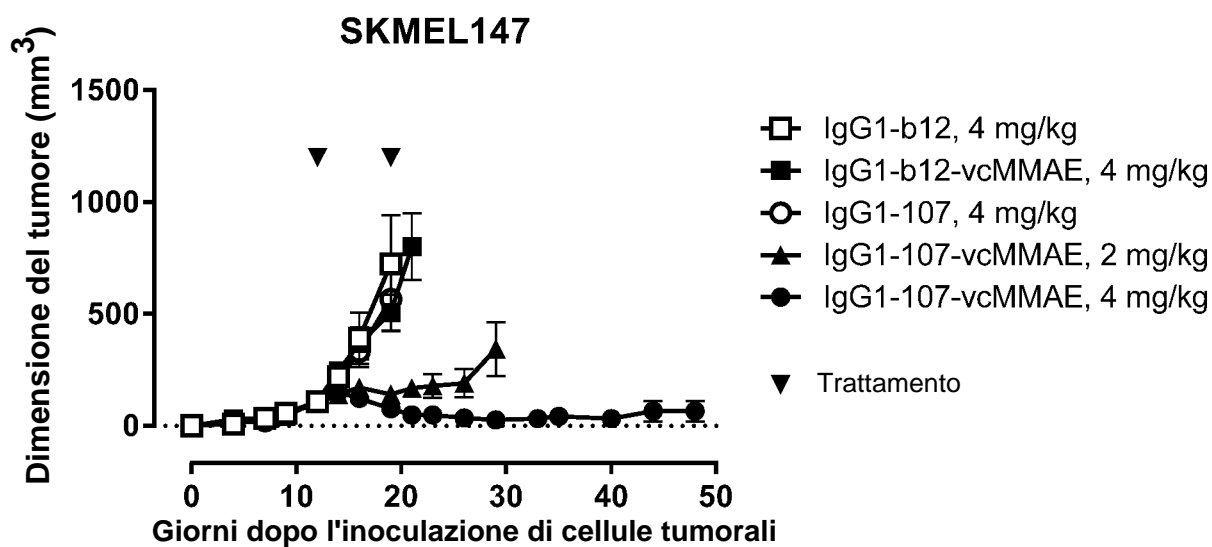
D



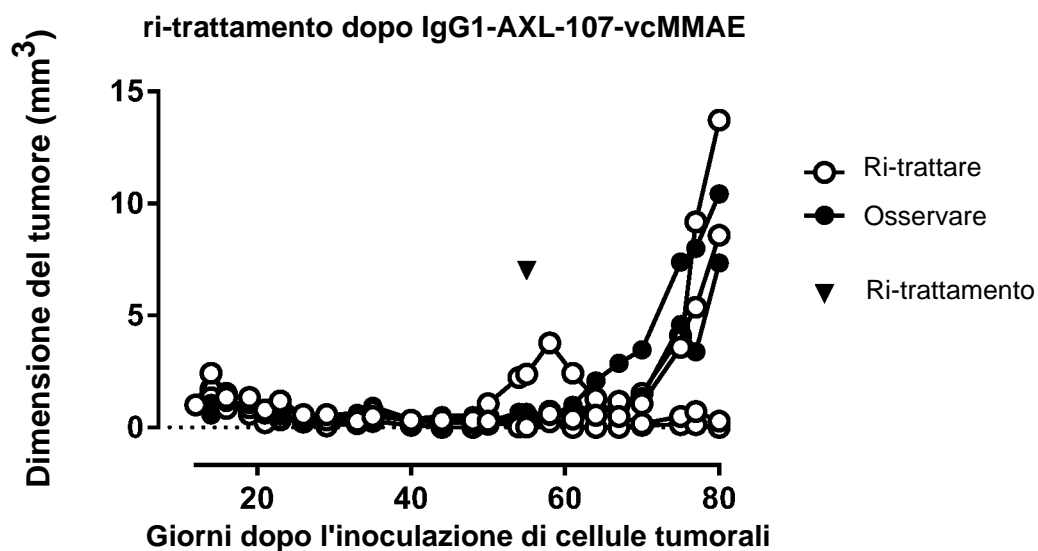
Polypio Montebello

Figura 36

A



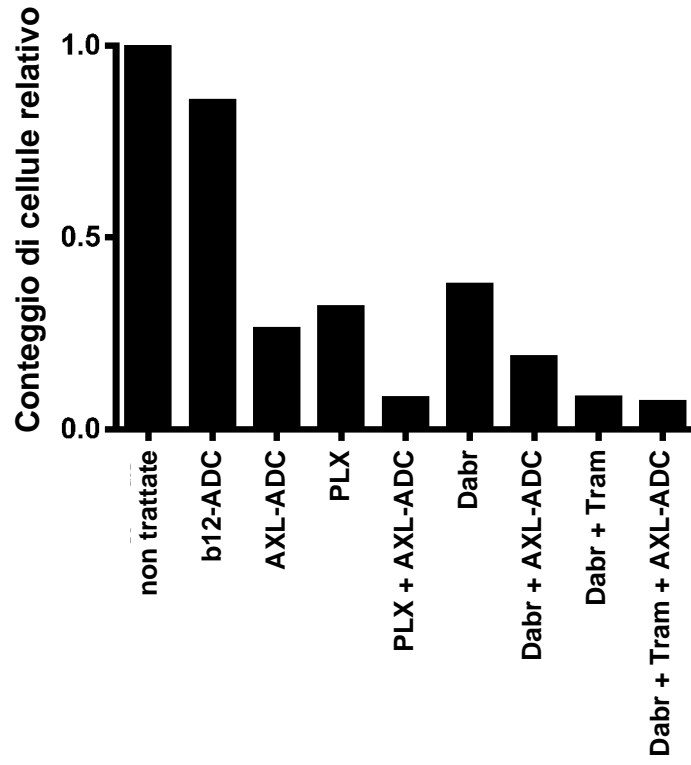
B



Polypo Montebelloni

Figura 37

A



B

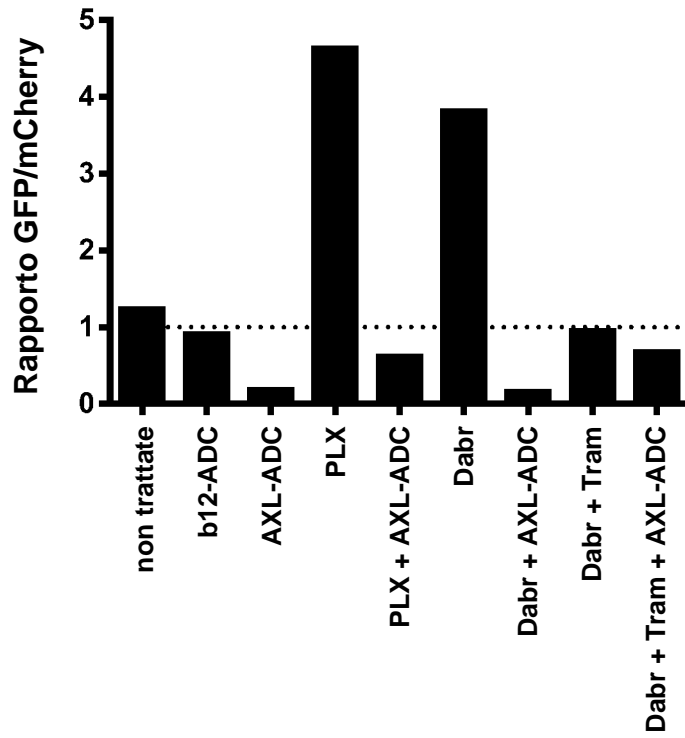
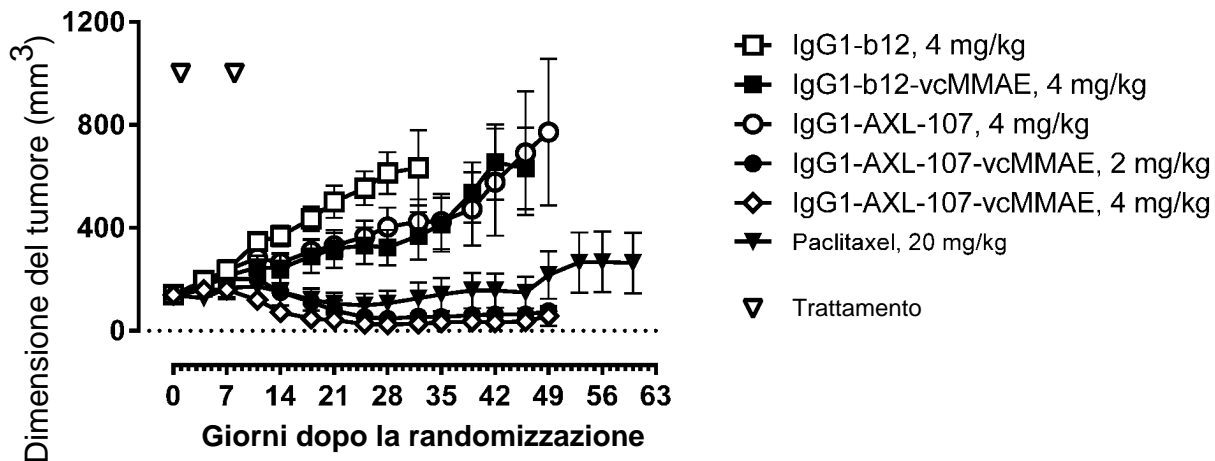
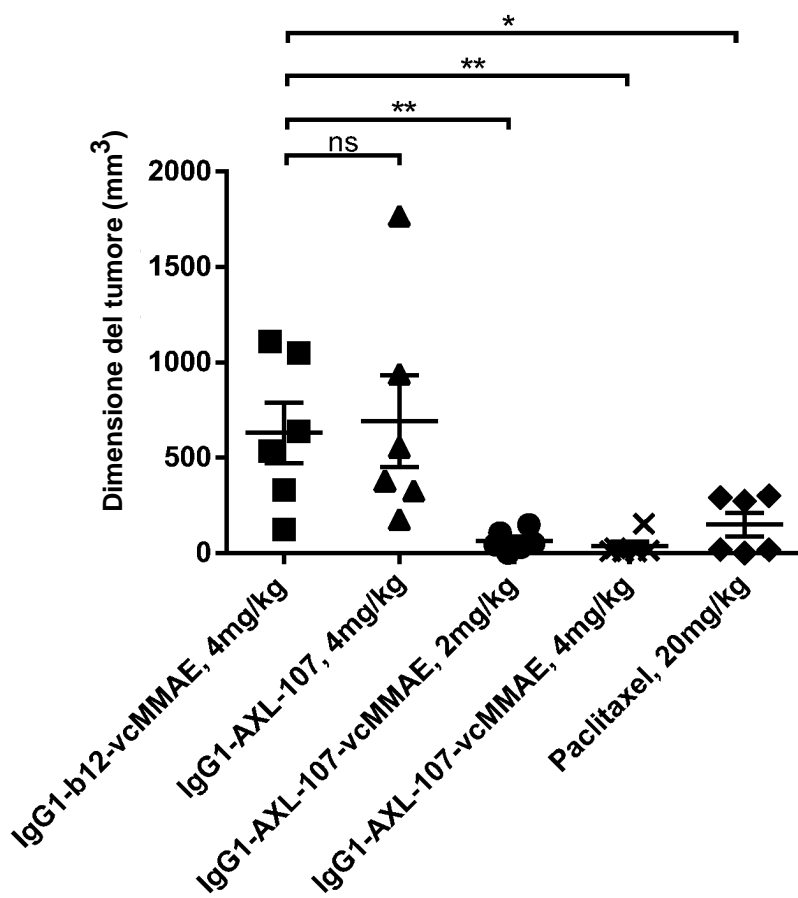


Figura 38

A



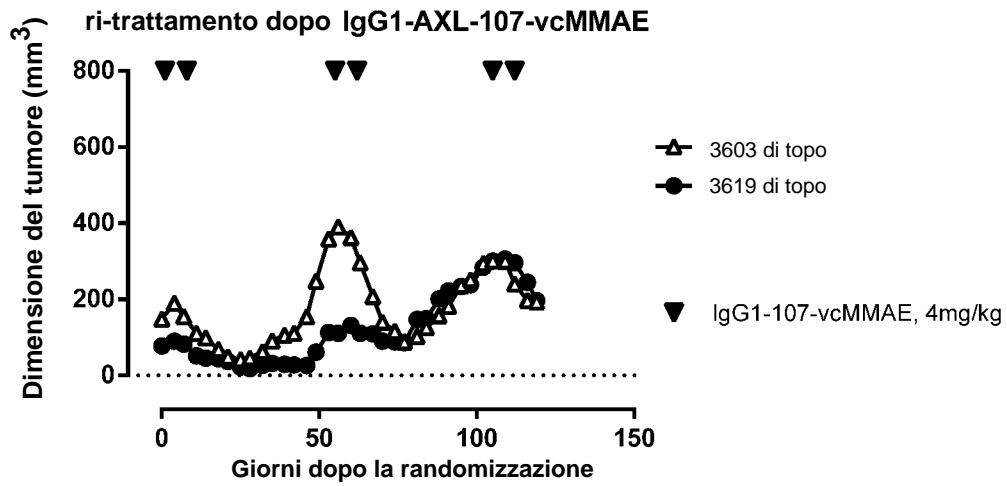
B



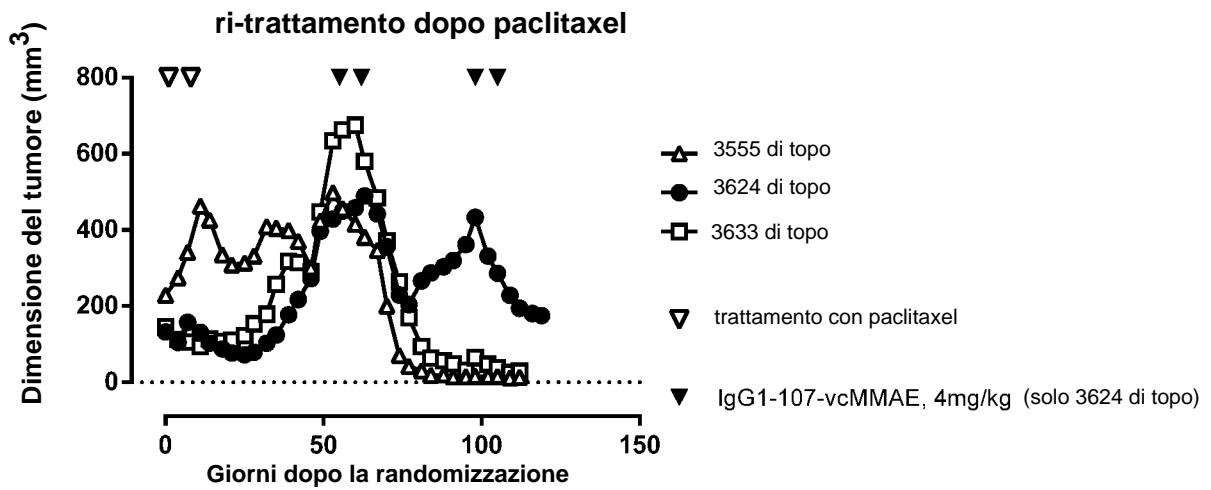
Polypa Montebelloni

Figura 38 (continuata)

C



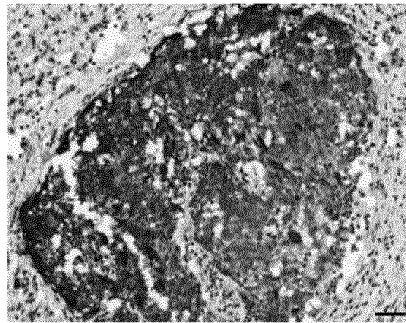
D



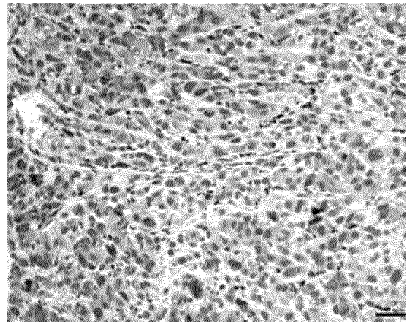
Polyp Montech

Figura 39

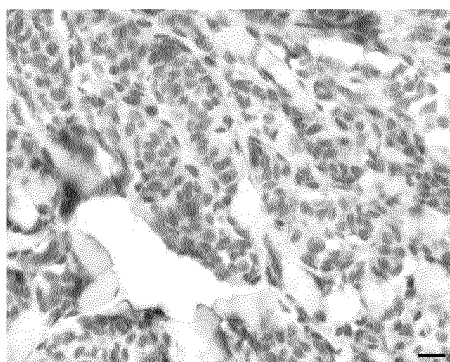
A



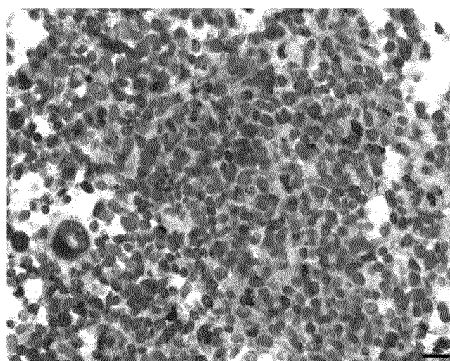
B



C



D



Polypo Moutch