

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 367**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)
G01N 33/32	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/EP2012/062115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12729604 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2723377**

54 Título: **Anticuerpos anti-Axl y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.06.2011 EP 11305792
04.07.2011 US 201161504256 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2018

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
ORIBASE PHARMA (25.0%);
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (25.0%) y
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE
MONTPELLIER - VAL D'AURELLE (25.0%)

72 Inventor/es:

ROBERT, BRUNO;
FAUVEL, BÉNÉDICTE;
CHEVE, GWÉNAËL;
YASRI, AZIZ;
LARBOURET, CHRISTEL;
LECONET, WILHEM;
CHARDES, THIERRY;
LARROQUE, CHRISTIAN y
PELEGRIN, ANDRÉ

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 677 367 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-Axl y usos de los mismos

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Axl y a usos de los mismos en métodos de diagnóstico y terapéuticos.

10 **Estado de la técnica**

Axl pertenece a la subfamilia TAM de tirosina quinasas receptoras (RTK, *receptor tyrosine kinases*) que también incluye Tyro3 y Mer. Los receptores TAM se caracterizan por una combinación de dos dominios de tipo inmunoglobulina y repeticiones dobles de fibronectina de tipo III en la región extracelular y un dominio de quinasa citoplasmática. Los ligandos de los receptores TAM son Gas6 (la proteína específica del gen 6 de la detención del crecimiento) y la proteína S, dos proteínas dependientes de la vitamina K que muestran un 43 % de identidad de secuencias de aminoácidos y comparten estructuras de dominios similares. Cada proteína tiene un dominio Gla N-terminal que contiene 11 restos de ácido g-carboxiglutámico, seguidos de cuatro módulos de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), y una estructura de tipo globulina de unión a la hormona sexual (SHBG, *sex hormone-binding globulin*) C-terminal que consiste en dos dominios de laminina G en tándem. El dominio de la SHBG es tanto necesario como suficiente para la unión y activación del receptor TAM, mientras que el dominio Gla une los fosfolípidos de membrana cargados negativamente y desempeña un papel importante en la fagocitosis mediada por TAM de células apoptóticas. La activación y señalización de TAM ha estado implicada en múltiples respuestas celulares incluida la supervivencia, proliferación, migración y adhesión celular.

La regulación errónea de Axl o su ligando Gas6, está implicada en la patogénesis de una variedad de cánceres humanos. La sobreexpresión de Axl se ha presentado en una amplia gama de cánceres humanos (de pulmón, de próstata, de mama, gástrico, pancreático, de ovario, de tiroides, cánceres de sangre, carcinoma de células renales así como glioblastoma...) y está asociada a invasividad, metástasis y pronóstico negativo. Estos hallazgos sugieren que Axl puede intervenir en la regulación de múltiples aspectos de tumorigénesis incluyendo el crecimiento, la invasión y la angiogénesis tumoral y por lo tanto representa una diana para la intervención terapéutica en cáncer, especialmente para el desarrollo de terapia contra el cáncer metastásico y para otros tratamientos múltiples de cáncer incluido el tratamiento de la resistencia a los fármacos.

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales anti-Axl se han descrito para el uso en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las publicaciones relativas a los anticuerpos anti-Axl incluyen los documentos WO2009/063965, WO2009/062690 y WO2011/014457.

Otras funciones de Axl dependientes o no de sus ligandos, tal como la inhibición de las funciones inmunitarias, la activación de la agregación plaquetaria y la inducción de infecciones víricas (como ejemplo, la captación de los virus del Ébola y Lassa está promovida por Axl) resaltan el potencial de Axl como diana terapéutica para otras aplicaciones diferentes a la oncología.

Objeto de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por Axl, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1, la SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2 y la SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3; y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1, la SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2 y la SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3. Dicho anticuerpo monoclonal se une al dominio extracelular de Axl por medio de, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10.

Descripción detallada de la invención55 **Definiciones:**

El término "Axl" tiene su significado general en la técnica y se refiere a Axl humano. Axl se conoce también como "Ark", "Tyro- 7", "ufo" o "jtk11".

60 La expresión "anticuerpo anti-Axl" se refiere a un anticuerpo dirigido contra Axl.

De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usarán de manera similar en la presente invención. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo no solo incluye moléculas completas de anticuerpo, sino también fragmentos de

anticuerpos, así como variantes (incluidos derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas se enlazan entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada se enlaza a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados conjuntamente CH). Las regiones variables de las cadenas tanto ligera (VL) como pesada (VH), determinan el reconocimiento de unión con el antígeno y la especificidad del mismo. Los dominios de la región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH), confieren propiedades biológicas importantes tales como la asociación de cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento y la unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por restos que son principalmente de las regiones determinantes de complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) o hipervariables. Ocasionalmente, los restos de regiones marco conservadas (FR, *framework*) o no hipervariables, influyen en la estructura de dominio global y por lo tanto en el sitio de combinación. Las Regiones Determinantes de Complementariedad o CDR, se refieren a secuencias de aminoácidos que definen en conjunto la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativa. Cada una de las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tiene tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión al antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena ligera y pesada. Las regiones marco conservadas (FR), se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo 3E3E8, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

De acuerdo con la invención, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene una región marco conservada variable y regiones constantes de un anticuerpo humano pero que conserva las CDR del anticuerpo 3E3E8.

El término "Fab" representa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H (pesada) y toda la cadena L (ligera), entre los fragmentos obtenidos tratando la IgG con una proteasa, papaína, se enlazan entre sí a través de un enlace disulfuro.

El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión al antígeno, que es ligeramente más grande que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando la IgG con una proteasa, pepsina.

El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido Fv monocatenario ("scFv", *single chain Fv*) es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente, que se expresa normalmente a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL enlazados por un enlazador que codifica el péptido. Un "dsFv" es un heterodímero de VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes se pueden formar espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o se pueden generar acoplado los scFv monovalentes mediante un enlazador peptídico, tal como un sc(Fv)₂ divalente.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un anticuerpo de acuerdo con la invención o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", como se usa en el presente documento, significa que hay un porcentaje de macromoléculas biológicas del mismo tipo preferentemente de al menos 75 % en peso, más preferentemente de al menos 85 % en peso, aún más preferentemente de al menos 95 % en peso, y de manera más preferente de al menos 98 % en peso. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que carece sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o fracciones adicionales que no afectan perjudicialmente a las características básicas de la composición.

Anticuerpos de la invención:

5 La presente invención proporciona anticuerpos anti-Axl aislados o fragmentos de los mismos. En particular, los inventores han construido un hibridoma productor de anticuerpos anti-Axl murinos (3E3E8). Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligera y pesada de dicho mAb 3E3E8, y por lo tanto han determinado el dominio de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo según se describe en la Tabla 1:

Dominios del mAb 3E3E8	Secuencia
VH	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLTNYAVHWVRQPPGKGLE
	WLGVIWAGGSTNYNSALMSRLRISKDNSKSKVFFKMNSLQTDDTA MYYCARYYGSSLYPMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:1)
H-CDR1	NYAVH (SEQ ID NO:2)
H-CDR2	VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO:3)
H-CDR3	YGSSLYPMDY (SEQ ID NO:4)
VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRP QSPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTVFTLRISGVEAEDVGVYY CMQHLEYPWTFGGGTELEIK (SEQ ID NO:5)
L-CDR1	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO:6)
L-CDR2	RMSNLA (SEQ ID NO:7)
L-CDR3	MQHLEYPWT (SEQ ID NO:8)

10 Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por Axl, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3.

15 La invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por Axl, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.

20 El anticuerpo monoclonal de la invención, puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3 y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.

25 En particular, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-Axl que comprende:

- una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1, SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3; y
- una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1, SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.

30 En una realización particular, la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 1 y/o la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 5.

35 En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo quimérico, preferentemente un anticuerpo quimérico humano/de ratón. En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/ser humano puede comprender los dominios variables del anticuerpo 3E3E8 según se ha definido anteriormente.

40 En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones marco conservadas aceptoras humanas y,

opcionalmente, un dominio constante humano, cuando esté presente, y CDR donantes no humanas, tales como CDR de ratón según se ha definido anteriormente.

5 La invención proporciona además fragmentos anti-Axl dirigidos contra Axl de dichos anticuerpos que incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

La invención proporciona además anticuerpos o fragmentos anti-Axl que se unen a secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 en la parte extracelular de Axl.

mAb 3E3E8	Secuencia de Axl humano (epítipo)
dominio 1 de FN3	NLHLVSR (SEQ ID NO:9)
dominio 2 de FN3	VLMDIGLRQEVTLE (SEQ ID NO:10)

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

15 **Métodos para producir los anticuerpos de la invención:**

Los anticuerpos anti-Axl de la invención se pueden producir por cualquier técnica conocida en la materia, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, en solitario o en combinación.

20 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar usando un método de fase sólida bien conocido, usando preferentemente un aparato de síntesis de péptidos disponible en el comercio (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener como productos de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos, en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales se pueden aislar después usando técnicas bien conocidas.

30 Por consiguiente, un objetivo adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Más particularmente, la secuencia de ácidos nucleicos codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo de la invención.

35 Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector vírico.

40 Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión", significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) se puede introducir en una célula hospedadora, para transformar de esta manera el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

45 Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, un potenciador, un terminador y elementos similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo después de la administración a un sujeto. Como ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para una célula animal, se incluye el promotor y potenciador temprano de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), El promotor y potenciador de LTR del virus de la leucemia de Moloney en ratones (Kuwana Y et al. 1987), el promotor (Mason JO et al. 1985) y potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena H de la inmunoglobulina y similares.

50 Se puede usar cualquier vector de expresión para una célula animal, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique la región C de los anticuerpos humanos. Como ejemplos de vectores adecuados se incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al. 1990) y similares.

60 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integradores, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vectores víricos incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, de herpes virus y de AAV. Dichos virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en la materia, tal como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Como ejemplos típicos de células de empaquetamiento vírico se incluyen células PA317, células PsiCRIP, células G_{Penv}+, células 293, etc. Protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes, defectuosos para la replicación, se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que se ha transfectado, infectado o transformado por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN, en una célula hospedadora, de tal manera que la célula hospedadora expresará el gen o la secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducidos. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducidos ha sido "transformada".

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por un ADN extraño llevado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras y vectores plasmídicos de *E. coli*, células hospedadoras de insectos y vectores de Baculovirus, y células hospedadoras y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos *E. coli*, levaduras de *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8. 653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G *et al.*; 1980), células YB2/3HL. P2. G11.16Ag. 20 de rata (ATCC CRL1662, en lo sucesivo denominada "célula YB2/0") y similares.

La presente invención también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector, según se ha descrito anteriormente, en una célula hospedadora competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresen y/o secreten dicho anticuerpo. Dichas células hospedadoras recombinantes se pueden usar para la producción de los anticuerpos de la invención.

En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

- (i) cultivar el hibridoma 3E3E8 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo 3E3E8; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En una realización particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente invención se puede producir obteniendo secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se ha descrito anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolo en un vector de expresión de células animales que tiene genes que codifican el CH del anticuerpo humano y el CL del anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

El dominio CH de un anticuerpo quimérico humano puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, aunque las de la clase de IgG son adecuadas y se puede usar también una cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase de IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, como el CL de un anticuerpo quimérico humano puede ser cualquier región que pertenezca a la Ig, y se pueden usar las de la clase kappa o lambda.

En la materia se conocen bien métodos para producir anticuerpos quiméricos que implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección de genes (Véase Morrison SL. *et al.* (1984) y los documentos de patente US5.202.238; y US5.204.244).

El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede producir obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican dominios de la CDR, como se ha descrito anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolo en un vector de expresión de células animales que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que existe un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo en vectores distintos o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en las células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo tándem (Shitara K *et al.* 1994). Como ejemplos de vectores de expresión de anticuerpos humanizados de tipo tándem se incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

En la materia se conocen bien métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección de genes (Véase, por ejemplo, Riechmann L. *et al.* 1988; Neuberger MS. *et al.* 1985). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación de PCT WO91/09967; Patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), rebarnizado o rechapado (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM *et al.* (1994); Roguska MA. *et al.* (1994)), y reordenamiento de cadenas (Patente de Estados Unidos n.º 5.565.332). También se conoce la tecnología de ADN recombinante general para la preparación de dichos anticuerpos (véase la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

El Fab de la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, la papaína. Además, el Fab se puede producir insertando ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariota, o para el sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el Fab.

El F(ab')₂ de la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, la pepsina. Además, el F(ab')₂ se puede producir uniendo el Fab' descrito a continuación por medio de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente invención se puede obtener tratando el F(ab')₂ que reacciona específicamente con Axl con un agente reductor, el ditiotreitól. Además, el Fab' se puede producir insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariota, o en un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

El scFv de la presente invención se puede producir obteniendo el ADNc que codifica los dominios VH y VL como se ha descrito anteriormente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota, o en un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento de scFv humanizado, se puede usar una tecnología muy conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) a partir de un fragmento de scFv donante, e injertarlas en una región marco conservada del fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos W098/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Se contempla la modificación o las modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando solo las CDR en el VH y VL de un anticuerpo procedente de un animal no humano en las FR del VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original procedente de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácidos del VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en las FR, se asocian directa o indirectamente con la actividad de unión al antígeno. De este modo, la sustitución de estos restos de aminoácidos con diferentes restos de aminoácidos procedentes de las FR del VH y VL del anticuerpo humano, reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humana, se ha intentado identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR del VH y VL de anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que esté asociado directamente con la unión al anticuerpo, o que interactúe con un resto de aminoácido de la CDR, o que conserve la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad reducida de unión al antígeno, podría incrementarse sustituyendo los aminoácidos identificados por restos de aminoácidos del anticuerpo original procedente de un animal no humano.

Se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las

secuencias de ADN que los codifican, y seguir obteniendo una molécula funcional que codifica un anticuerpo con las características deseables.

5 Al realizar cambios en las secuencias de aminoácidos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la materia. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le asigna un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y de carga, estas son:
10 isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

15 Un objetivo adicional de la presente invención también incluye variantes conservadoras de las funciones de los anticuerpos de la presente invención.

"Las variantes conservadoras de las funciones" son aquellas en las que se ha cambiado un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y función generales del polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, la sustitución de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión a hidrógeno, ácidas, básicas, hidrófobas, aromáticas y propiedades similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados, pueden diferir en una proteína de tal manera que el porcentaje de similitud de secuencias de aminoácidos o proteínas entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según se determina de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el Método Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de las funciones" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos según se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 85%, todavía preferentemente al menos un 90 %, e incluso más preferentemente un 95 %, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o precursora con la que se compara.
30

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80 %, preferentemente más del 85 %, preferentemente más del 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90 %, preferentemente más del 95 %, son similares (funcionalmente idénticos) con respecto a la longitud completa de la secuencia más corta. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa pileup de GCG (Genetics Computer Group, Manual de Programa para el Paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias tal como BLAST, FASTA, etc.
35

40 Por ejemplo, determinados aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Puesto que la capacidad y la naturaleza interactivas de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, en una secuencia proteica se pueden realizar determinadas sustituciones de aminoácidos, y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, mientras que, sin embargo, se obtiene una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que puedan realizarse varios cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o secuencias correspondientes de ADN que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.
45

50 En la materia se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tengan una puntuación o un índice hidropático similar y que aún dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, se sigue obteniendo una proteína biológica funcionalmente equivalente.

Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien cuáles son las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta varias de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.
55

Por consiguiente, la invención también proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende:

- 60 - una H-CDR1 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 2,
- una H-CDR2 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 3,
65 - una H-CDR3 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 4,
- una L-CDR1 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID

- NO: 6,
 - una L-CDR2 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 7,
 - una L-CDR3 que tiene al menos un 90 % o 95 % de identidad con la secuencia que se muestra como SEQ ID NO: 8, y
 - que se une específicamente a Axl sustancialmente con la misma afinidad que un anticuerpo, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H- CDR3 y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L- CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3, y más preferentemente sustancialmente con la misma afinidad que el anticuerpo anti-Axl murino, 3E3E8.

Por consiguiente, la invención también proporciona un anticuerpo que se une al dominio 1 de FN3 y al dominio 2 de FN3 de la parte extracelular de Axl (secuencias de aminoácidos del epítipo de Axl SEQ ID NO: 9 y SEQ ID: 10).

- La unión específica de dichos anticuerpos se puede ensayar por cualquier método conocido en la materia. Para el agrupamiento de epítomos se pueden usar muchos formatos de ensayo de unión competitivos diferentes. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos que usan técnicas tales como transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de precipitina, ensayos de precipitina de difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, y ensayos de fijación al complemento. Dichos ensayos son habituales y muy conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York). Por ejemplo, el BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es uno de una variedad de formatos de ensayo de resonancia de plasmón superficial que se usa habitualmente en paneles de agrupamiento de epítomos de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos habituales de bloqueo cruzado, tales como los descritos en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988.

- Los anticuerpos de la invención diseñados por ingeniería genética, incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los restos de la región marco conservada dentro del VH y/o del VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones en la región marco conservada se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más restos de la región marco conservada en la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos de la región marco conservada que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar comparando las secuencias marco conservadas del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que procede el anticuerpo. Para reestablecer las secuencias de la región marco conservada a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende incluir en la invención tales anticuerpos "retromutados". Otro tipo de modificación en la región marco conservada implica mutar uno o más restos en la región marco conservada o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T para reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque se denomina también "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030153043 por Carr *et al.*

- Además, o como alternativa a las modificaciones realizadas en la región marco conservada o en las regiones CDR, los anticuerpos de la invención se pueden modificar por ingeniería genética para que incluyan modificaciones en la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación al complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Asimismo, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más grupos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de EU de Kabat.

- En una realización, la región bisagra de CHI se modifica de tal manera que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región bisagra de CHI se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

- En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz de los dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene deteriorada la unión de la proteína A estafilocócica (SpA) en relación con la unión de la SpA con el dominio bisagra de Fc natural. Ward *et al.* describen este enfoque con más detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.165.745.

- En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como describe

Ward en la patente de Estados Unidos n.º 6.277.375. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, El anticuerpo se puede alterar en la región CHI o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate extraído de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como describen Presta et al en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.869.046 y 6.121.022.

5 En otras realizaciones más, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos por un resto de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

15 En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de restos de aminoácidos, se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551 de Idusogie et al.

20 En otra realización, se alteran uno o más restos de aminoácidos para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación de PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

25 En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, siglas del inglés *antibody dependent cellular cytotoxicity*) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc, modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación de PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn, se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591-6604, WO2010106180).

30 En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden generar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región marco conservada variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

40 Adicionalmente, o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado, que tenga, o no, cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNAc bisectoras aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de los anticuerpos para mediar en la ADCC. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. En la técnica se han descrito células con maquinaria de glucosilación alterada, y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular presentan hipofucosilación o están desprovistos de restos de fucosilo. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la invención se pueden producir por expresión recombinante en una línea celular que presente o no un patrón de hipofucosilación, por ejemplo, en una línea celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. La publicación de PCT WO 03/035835 de Presta, describe una variante de la línea celular CHO, células Lecl3, con capacidad reducida para unir fucosa a hidratos de carbono enlazados a Asn(297), que también da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). La Publicación de PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética, para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, la beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNAc bisectoras aumentadas que dan como resultado una actividad aumentada de los anticuerpos para mediar en la ADCC (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Eureka Therapeutics describe adicionalmente células CHO de mamífero modificadas por ingeniería genética, capaces de producir anticuerpos con un patrón de glucosilación de mamífero alterado desprovisto de restos de fucosilo (<http://www.eurekainc.com/a&bou-tus/companyoverview.html>). Como alternativa, los anticuerpos de la invención se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos modificados por ingeniería genética para el patrón de glucosilación de tipo mamífero y capaces de producir anticuerpos carentes de fucosa como patrón de glucosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos que contempla la invención en el presente documento, es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, reacciona normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo y soluble en agua). Tal como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglucosilado. En la materia se conocen métodos para pegar proteínas y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP O 154 316 de Nishimura et al. y el documento EP O 401 384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la invención, es un conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la invención, con una proteína sérica, tal como seroalbúmina humana o un fragmento de la misma, para aumentar la semivida de la molécula resultante. Este enfoque se describe, por ejemplo, en Ballance et al. documento EP0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la invención, con proteínas capaces de unirse a proteínas séricas, tal como seroalbúmina humana, para aumentar la semivida de la molécula resultante. Este enfoque se describe, por ejemplo, en Nygren et al., documento EP O 486 525.

Inmunconjugados:

Un anticuerpo de la invención se puede conjugar con un marcador detectable para formar un inmunconjugado anti-Axl. Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los expertos en la materia conocen bien métodos de fabricación y detección de dichos inmunconjugados marcados de manera detectable y se describen a continuación con más detalle.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para los fines de la presente invención son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

Los inmunconjugados anti-Axl también se pueden marcar con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia se determina exponiendo el inmunconjugado a la luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos marcadores fluorescentes incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Como alternativa, los inmunconjugados anti-Axl se pueden marcar de manera detectable acoplado un anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunconjugado etiquetado con un compuesto quimioluminiscente, se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De manera similar, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar inmunconjugados anti-Axl de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcado incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

Como alternativa, los inmunconjugados anti-Axl se pueden marcar de manera detectable enlazando un anticuerpo monoclonal anti-Axl con una enzima. Cuando el conjugado de anti-Axl/enzima se incuba en presencia del sustrato apropiado, la fracción enzimática reacciona con el sustrato para producir una fracción química que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Los ejemplos de enzimas que se pueden usar para marcar inmunconjugados poliespecíficos de manera detectable, incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de las fracciones del marcador con anticuerpos monoclonales anti-Axl, se puede lograr usando técnicas estándar conocidas en la materia. La metodología típica a este respecto la describen Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1, 1976; Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1, 1977; Shih et al., Int'l J. Cancer 46: 1101, 1990; Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990; y Coligan, *citados anteriormente*.

Además, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunquímica puede potenciarse usando anticuerpos monoclonales anti-Axl que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina. (Véase, por ejemplo, Wilchek et al. (eds.), "Avidin-Biotin Technology, "Methods In Enzymology (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer et al.,

"Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology, " en *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992.)

Los métodos para llevar a cabo los inmunoensayos están bien establecidos. (*Véase, por ejemplo*, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays, " en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208 (Ritter y Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology, " en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120 (Birch y Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).)

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de fármaco/anticuerpo monoclonal anti-Axl. Un "conjugado de fármaco/anticuerpo monoclonal anti-Axl" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-Axl de acuerdo con la invención conjugado con un agente terapéutico. Tales conjugados de fármaco/anticuerpo monoclonal anti-Axl producen efectos clínicamente beneficiosos en células que expresan Axl cuando se administra a un sujeto, tal como, por ejemplo, un sujeto con un cáncer que expresa Axl, normalmente cuando se administra solo pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

En realizaciones típicas, un anticuerpo monoclonal anti-Axl se conjuga con un agente citotóxico, de tal manera que el conjugado de fármaco/anticuerpo resultante, ejerce un efecto citotóxico o citostático en una célula que expresa Axl (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa Axl) cuando la célula lo capta o lo internaliza. Las fracciones particularmente adecuadas para la conjugación con anticuerpos son agentes quimioterapéuticos, enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radioactivos, o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-Axl se puede conjugar con un agente citostático o citocida, tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida, tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica).

Las clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auriestatinas, aglutinantes del surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino, tales como, cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizantes de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformadores, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasas, alcaloides de la vinca o similares.

Agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065 (Li et al., *Cancer Res.* 42:999-1004, 1982), clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, dacarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, fosfato de etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, estreptoizotocina, tenopósido (VM-26), 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

Agentes citotóxicos particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), aglutinantes del surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptoteína), topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermólido, eleuterobina y mitoxantrona.

En determinadas realizaciones, un agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional, tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, agentes fuertes, tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina, se pueden enlazar a un anticuerpo que exprese anti-Axl.

En variaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Normalmente, el derivado de auristatina E es, *por ejemplo*, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaprofina-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaprofina-fenilalanina), y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030083263; publicaciones de patentes internacionales n.º WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y patentes de Estados Unidos n.º 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744;

4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En otras variaciones, el agente citotóxico es un agente de unión del surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.130.237). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente de unión del surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión del surco menor es una enediina (por ejemplo calicheamicina).

En determinadas realizaciones, un conjugado de fármaco/anticuerpo comprende un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, taxanos por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de la bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemaotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermólido y eleuterobina. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131, 1992).

En otras realizaciones, el agente citotóxico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl se conjuga con una enzima convertidora de profármacos. La enzima convertidora de profármacos puede fusionarse de manera recombinante con el anticuerpo o conjugarse químicamente con el mismo usando métodos conocidos. Son ejemplos de enzimas convertidoras de profármacos, carboxipeptidasa G2, β-glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β-lactamasa, β-glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Se conocen bien técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos. (Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58. Véase también, por ejemplo, la publicación de PCT WO 89/12624.)

Usos diagnósticos:

Un objetivo adicional de la invención se refiere a un anticuerpo anti-Axl de la invención para diagnosticar y/o controlar una enfermedad cancerosa y otras enfermedades en las que los niveles de Axl se modifican (aumentan o disminuyen).

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se pueden marcar con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otro marcador conocido en la materia tal y como se han descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede marcar con una molécula radioactiva mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero sin limitación, átomos radiactivos para estudios de gammagrafía, tales como, 1123, 1124, In111, Re186, Re188. Los anticuerpos de la invención se pueden marcar también con un marcador de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor- 18, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Después de la administración del anticuerpo, se detecta la distribución del anticuerpo en el paciente. Los expertos en la materia conocen métodos para detectar la distribución de cualquier marcador específico y se puede usar cualquier método apropiado. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, tomografía computarizada (CT), tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM), fluorescencia, quimioluminiscencia y sonografía.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para diagnosticar y estadificar enfermedades cancerosas asociadas a la sobreexpresión de Axl (por ejemplo, en radioimágenes). Las enfermedades cancerosas asociadas a la sobreexpresión de Axl incluyen normalmente, pero sin limitación, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, tumores de células gliales, tal como, glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, sarcomas, cánceres hematológicos (leucemias), astrocitomas, y varios tipo de cáncer

de cabeza y cuello u otras enfermedades hiperproliferativas que expresen o sobreexpresen Axl.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para diagnosticar enfermedades distintas de cánceres, para las cuales la expresión de Axl aumenta o disminuye (forma de Axl soluble o celular).

5 Normalmente, dichos métodos de diagnóstico implican el uso de una muestra biológica obtenida del paciente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" incluye una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto y se pueden usar en un ensayo de diagnóstico o de control. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, muestras de sangre y de otros fluidos de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, 10 tales como especímenes de biopsia o cultivos tisulares o células procedentes de los mismos, y su progenie. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra tisular extraída de un individuo que se sospecha que tiene una enfermedad cancerosa asociada a la sobreexpresión de Axl, y en una realización preferida de glioma, gástrico, pulmonar, pancreático, de mama, de próstata, renal, hepático y de endometrio. Por lo tanto, las muestras biológicas comprenden muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, 15 suero, plasma, muestras de líquido biológico y tisulares.

En una realización particular, la invención es un método para diagnosticar una enfermedad cancerosa asociada a la sobreexpresión de Axl en un sujeto mediante la detección de Axl en células del sujeto usando el anticuerpo de la invención. En particular, dicho método de diagnóstico puede comprender las etapas que consisten en:

- 20 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto propenso a sufrir una enfermedad cancerosa asociada a la sobreexpresión de Axl, con un anticuerpo de acuerdo con la invención, en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con las células de la muestra biológica que expresan Axl;
- 25 (b) detectar y/o cuantificar dichos complejos, con lo que la detección de dichos complejos es indicativa de una enfermedad cancerosa asociada a la sobreexpresión de Axl.

Para controlar la enfermedad cancerosa, el método de diagnóstico de acuerdo con la invención, se puede repetir en diferentes intervalos de tiempo, para determinar si la unión del anticuerpo con las muestras aumenta o disminuye, con lo que se determina si la enfermedad cancerosa avanza o retrocede.

30 En una realización particular, la invención es un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a la expresión o a la sobreexpresión de Axl o a la disminución o al aumento de la forma soluble de Axl, tal como trastornos inmunitarios humanos, con el anticuerpo anti-Axl de la invención también se pueden diagnosticar enfermedades trombóticas (trombosis y aterotrombosis) y cardiovasculares.

35 **Usos terapéuticos:**

Los anticuerpos, fragmentos o inmunoconjugados de la invención, pueden ser útiles para tratar cualquier enfermedad asociada a la expresión de Axl, preferencialmente cánceres. Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con cualquier agente adecuado.

- 45 1) el anticuerpo anti-Axl de la divulgación se puede usar como tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas a Axl y/o a la expresión, sobreexpresión o activación de Gas6. No hay limitaciones particulares en los tejidos tumorales, y los ejemplos incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, tumores de células gliales tal como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, sarcomas, cánceres hematológicos (leucemias), astrocitomas y varios tipos de cáncer de 50 cabeza y cuello. Los cánceres más preferentes son glioma, gástrico, pulmón, pancreático, de mama, de próstata, renal, hepático y de endometrio.
- 2) los anticuerpos anti-Axl de la divulgación son posibles activadores de la respuesta inmunitaria innata y se pueden usar en el tratamiento de trastornos inmunitarios humanos, tal como septicemia, se pueden usar como adyuvantes para la inmunización tal como para una vacuna y se pueden usar como agentes antiinfecciosos (contra bacterias, virus, parásitos)
- 55 3) el anticuerpo anti-Axl de la invención puede proteger contra o tratar enfermedades trombóticas tales como trombosis venosa y arterial y aterotrombosis
- 4) el anticuerpo anti-Axl de la divulgación puede proteger, impedir o tratar enfermedades cardiovasculares
- 60 5) el anticuerpo anti-Axl de la divulgación pueden impedir o inhibir la entrada de virus tales como los virus de Lassa y Ébola y se puede usar para tratar infecciones víricas

En cada una de las realizaciones de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo monoclonal anti-Axl, se administra de manera coherentes con las metodologías convencionales asociadas a la gestión de la enfermedad o trastorno para los cuales se desea el tratamiento. De acuerdo con la divulgación del presente documento, a un sujeto que necesita dicho tratamiento se le administra una cantidad eficaz del anticuerpo o conjugado de fármaco/anticuerpo durante un tiempo y en

condiciones suficientes para impedir o tratar la enfermedad o trastorno.

Por lo tanto, un objetivo de la divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada a la expresión de Axl, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento o inmunocombinado de la invención.

En el contexto de la invención, los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, significan invertir, aliviar, inhibir el avance de, o impedir el trastorno o afección en quienes se aplican dichos términos, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

De acuerdo con la invención, las expresiones "paciente" o "paciente que lo necesite", hacen referencia a un ser humano afectado o propenso a estar afectado por la enfermedad asociada a la sobreexpresión de Axl.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo de la invención se entiende una cantidad suficiente del anticuerpo para tratar dicho cáncer, con una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá, que el uso diario total de los anticuerpos y de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para un paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del anticuerpo específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del anticuerpo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o a la vez con el anticuerpo específico empleado; y factores similares bien conocidos en la práctica médica. Por ejemplo, es bien sabido dentro de la experiencia de la técnica, empezar con dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

En determinadas realizaciones, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, se usa un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo en combinación con un segundo agente. Cuando se usa para tratar el cáncer, se puede usar un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo de la presente invención en combinación con terapias convencionales contra el cáncer, tales como, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la combinación de la terapia contra el cáncer con un anticuerpo anti-Axl o un conjugado de fármaco/anticuerpo de acuerdo con la presente invención, incluyen agentes antiangiogénicos. En algunos aspectos, un anticuerpo o conjugado fármaco/anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se coadministra con una citocina (por ejemplo, una citocina que estimula una respuesta inmunitaria contra un tumor).

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo como se describe en el presente documento, se usa en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa (TKI).

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo como se describe en el presente documento, se usa con otro anticuerpo monoclonal terapéutico (mAb). Trastuzumab (Herceptin, Roche), Bevacizumab (Avastin, Roche) y Cetuximab (Erbix, Merck) son tres de estos mAb que han sido aprobados. Otros mAb incluyen, aunque sin limitación: Infliximab (Remicade, Johnson&Johnson), Rituximab (Rituxan, Roche), Adalimumab (Humira, Abbott) y Natalizumab (Tysabri, Biogen).

Composiciones farmacéuticas:

Para la administración, el anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado de fármaco/anticuerpo, se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-Axl o un conjugado de fármaco/anticuerpo se puede formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo que la molécula terapéutica se combina en una mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "transportador farmacéuticamente aceptable" si un paciente receptor puede tolerar su administración. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un transportador farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen otros transportadores adecuados. (Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19ª ed. 1995)) Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponadores, albúmina para impedir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen, naturalmente, de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, del peso y del género del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similar.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que pueda inyectarse. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración se pueden adaptar en función de varios parámetros, y en particular, en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o como alternativa, de la duración deseada del tratamiento.

Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo se puede disolver o dispersar en un transportador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma ha de ser estéril y ha de ser fluida hasta el punto que pueda inyectarse fácilmente. Ha de ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones de los compuestos activos en forma de base libre o como sales farmacéuticamente aceptables, se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Se puede formular un anticuerpo de la invención en una composición en una forma neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El transportador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, usando un revestimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede efectuarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse usando en las composiciones agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros principios enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes principios activos esterilizados, en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros principios requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

También se contempla la preparación de soluciones más concentradas, o fuertemente concentradas, para la inyección directa, en donde se prevé que el uso de DMSO como disolvente dé como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando concentraciones altas de los agentes activos en un área pequeña del tumor.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear

serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando, será necesario realizar alguna variación en la dosificación. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los anticuerpos de la invención se pueden formular en una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0, o incluso, aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Se pueden administrar también dosis múltiples.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporal; y cualquier otra forma usada actualmente.

En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos en las células hospedadoras. Los expertos en la materia conocen la formación y el uso de los liposomas y/o nanopartículas.

Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquiliacianoacrilato biodegradables que reúnen estos requisitos se contemplan para el uso en la presente invención, y dichas partículas se pueden elaborar fácilmente.

Los liposomas están formados a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (VML)). Generalmente, las VML tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . La exposición a ultrasonido de las VML da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (VUP) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.

Kits:

Finalmente, la invención también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención se utilizan en la detección de la expresión de Axl (aumento o disminución), o en ensayos terapéuticos o diagnósticos. Los kits de la invención pueden contener un anticuerpo acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contengan anticuerpos para la detección y cuantificación de Axl *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o en una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil para la detección puede proporcionarse con un marcador, tal como un marcador fluorescente o un radiomarcador.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: Experimentos ELISA para investigar la afinidad y la especificidad de anticuerpos monoclonales de ratón contra hAxl. Placas revestidas con Axl-Fc humano (h-Axl), Axl-Fc de ratón (m-Axl) o Mer-Fc humano (h-Mer), Tyro-3- Fc (h-Tyro-3), se incubaron con anticuerpos anti-Axl (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 o 3E3-E8). Tras el lavado, se añadió anti-IgG de ratón conjugado con HRP. 3E3-E8 no reaccionó de manera cruzada con h-Tyro-3 o con h-Mer o con m-Axl.

Figura 2: Análisis de citometría de flujo de Axl de superficie celular en A549. Células A549 se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-Axl (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 o 3E3-E8) y anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. La tinción con 3E3-E8 da como resultado un cambio de un orden de magnitud y demuestra la sobreexpresión de Axl en la superficie de estas células.

Figura 3: Medición de la afinidad de 3E3-E8 en presencia o no de Gas6 usando BIAcore. (A) Sin Gas6, los índices de asociación (k_a) y los índices de disociación (k_d) se calcularon usando un modelo de unión Langmuir sencillo, individualizado. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se obtuvo como resultado de la relación k_a/k_d . 3E3-E8 se une a Axl humano con alta afinidad, con una K_D de aproximadamente 1,6 nM. (B) 3E3-E8 no bloquea la unión del ligando Gas6 a Axl.

Figura 4: Experimentos ELISA para investigar los efectos del mAb 3E3-E8 sobre la fosforilación del receptor de Axl. Células de cáncer pancreático BXPC3, Capan-1, PANC1 y MIAPaCa-2, se privaron de suero,

se preincubaron con anticuerpos anti-Axl de ratón y se trataron con ligando Gas6. Los lisados celulares se transfirieron a placas de ELISA de tipo sándwich PathScan® Phospho-Axl (PanTyr) (RD Systems, Mineápolis, MN). Comparado con otros anticuerpos, 3E3-E8 fue capaz de bloquear o reducir significativamente la activación de Axl mediada por Gas6 en las cuatro líneas celulares como se indica por los niveles de fosforilación de Axl reducidos en células estimuladas por Gas6.

Figura 5: Ensayo de cicatrización de heridas/arañazos para investigar los efectos de los anticuerpos anti-Axl de ratón sobre la migración y proliferación celular. Después de crecer hasta la confluencia, las células A549 se privaron de nutrientes y se laceraron con una punta de pipeta. El anti-Axl de ratón 3E3E8, redujo la repoblación del área despejada más significativamente que el mAb1, incluso aunque las células se tratasen con Gas6.

Figura 6: Ensayo de viabilidad celular para investigar la eficacia antiproliferativa del anti-Axl 3E3-E8. Células de cáncer pancreático Capan-1, PANC1 y MIAPaCa-2 crecieron en un medio y durante 5 días se trataron a las concentraciones de mAb1 o 3E3-E8 indicadas. La viabilidad celular se midió con MTS. 3E3-E8 inhibe más el crecimiento de todas las líneas celulares evaluadas que mAb1 y el porcentaje de inhibición es dependiente de la concentración.

Figura 7: El anticuerpo monoclonal 3E3-E8 anti-Axl, induce una regulación negativa rápida del receptor de Axl e inhibe la ruta de Akt. Durante diferentes tiempos, se incubaron células Panc1 con 100 µg/ml de mAb 3E3-E8. Las células se lisaron y las proteínas totales se usaron para detección mediante transferencia Western. Como se muestra en la Figura 7A, rápidamente, el mAb 3E3-E8, regula negativamente la expresión del receptor de Axl en células Panc1. Después de una hora de incubación con el mAb 3E3-E8, las células se incubaron durante 30 minutos con Gas6 y mediante transferencia Western se analizó la presencia de fosforilación del receptor de Axl en tirosina 702 (activación de Axl) y de fosforilación de Akt en serina 473 (activación Akt). Tal como se muestra en la Figura 7B, la incubación del mAb 3E3-E8, conduce a una reducción en la fosforilación inducida por Gas6 de las proteínas Axl y Akt.

Figura 8: Modelos de xenoinjerto para investigar los efectos de los anticuerpos anti-Axl de ratón sobre el cáncer de mama triple negativo humano y el cáncer pancreático humano en ratones desnudos. MDA-MB-231 (células de cáncer de mama triple negativo) o MIAPaca-2, BXPC3 (células de cáncer pancreático), se implantaron en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. Los animales recibieron 300 µg/inyección de los anticuerpos anti-Axl de ratón. Durante el tratamiento, el crecimiento de los tumores se controló una vez por semana con un calibrador. En los ratones desnudos, el anticuerpo 3E3-E8 redujo más el crecimiento global de los tumores triple negativos y pancreáticos que el mAb1 (A, B, C) y, en comparación con el vehículo o con Gemcitabina, aumentó significativamente la supervivencia global en ratones xenoinjertados con células BXPC3 de cáncer pancreático (D). En tumores explantados con xenoinjertos de MIAPaca-2 que recibieron dos inyecciones, se observó también una expresión negativa drástica del receptor de Axl por el mAb 3E3-E8 (E)

Figura 9: Secuencia del hAxl-hFc y localización/secuencia del epítipo del mAb anti-Axl, 3E3-E8. El epítipo del anticuerpo anti-Axl, 3E3-E8, se identificó mediante ensayos de proteólisis limitada usando proteasas de Tripsina o de GluC y análisis de espectrometría de masas MALDI. La figura muestra la composición del antígeno (hAxl-hFc) usado en este experimento que está compuesto por los aminoácidos 33 a 440 del dominio extracelular de Axl fusionado a la parte Fc de la IgG1 humana y etiqueta de histidina. En la secuencia se indica cada uno de los dominios de tipo inmunoglobulina y los dominios de fibronectina 3 de la proteína Axl. El Mab 3E3-E8 se une a dos péptidos (epítipo conformacional) localizados en el primer y en el segundo dominios de fibronectina (en la secuencia de la proteína, las secuencias están en un recuadro y se detallan en la tabla).

Figura 10: Representación de un modelo del ectodominio de Axl humano y localización del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón, 3E3-E8 y dominio de unión a Gas6. La Figura 10A presenta una representación de tipo dibujo del modelo del dominio extracelular completo de Axl humano con los cuatro dominios marcados. En la figura 10B, se añadió un fragmento de los aminoácidos 305 a 315 de Gas6 como una lámina β gris claro, que ilustra el dominio de unión a Gas6 en el dominio 1 de tipo inmunoglobulina de Axl. Finalmente, la figura 10C muestra el epítipo de 3E3-E8 en los dominios 1 y 2 de tipo fibronectina como superficies grises. En primer lugar, esto confirma que las dos partes del epítipo están localizadas en la superficie externa de cada dominio. En segundo lugar, la figura 10C ilustra también que el sitio de interacción de Gas6 y el epítipo están situados alejados entre sí en el ectodominio de Axl humano.

Ejemplo:

Ejemplo 1: Generación de anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón

Mediante inmunización secuencial de ratones Balb/c, se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra Axl. Se hiperinmunizaron ratones Balb/c con dominio extracelular de Axl humano (hAxlECD) fusionado al dominio Fc humano (proteína hAxl-hFc; R&D systems). A los ratones Balb/c se les inyectó por vía subcutánea 10 µg de hAxl-hFc soluble los días 0,14 y 28 en presencia de adyuvante de Freund completo (primera inyección) o incompleto

(segunda y tercera inyección). Las células de bazo de los ratones se fusionaron con células de mieloma de ratón (PX63. Ag8.653; ATCC, Rockville, MD) usando un protocolo descrito anteriormente (Salhi *et al.* Biochem. J. 2004). Las células se cultivaron en placas (10^5 por pocillo) con medio HAT para la selección del hibridoma. Después de 12 días, se recogieron los sobrenadantes y la especificidad de unión a Axl (hAxl-hFc o hFc solo) se exploró mediante ensayo inmunoabsorbente directo ligado a enzimas (ELISA). Ocho clones positivos, que presentaban la inmunounión más alta después de la segunda ronda de subclonación por dilución limitante, se expandieron para la producción *in vitro* a gran escala de mAb. Los sobrenadantes acondicionados se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Proteína G.

10 **Ejemplo 2: Los anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón no reaccionan de manera cruzada con Axl de ratón o con otros miembros de la familia de receptores TAM humanos**

15 ***Ejemplo 2.1: Los anticuerpos monoclonales anti-axl de ratón no reaccionan de manera cruzada con Axl de ratón o con otros miembros de la familia de receptores TAM humanos según se determinó mediante ELISA***

Brevemente, placas revestidas con hAxl-hFc se saturaron con PBS de albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %, Tween 20 al 0,1 % (PBST).

20 Para el ensayo de reacción cruzada, las placas revestidas se incubaron con Axl-Fc humano (h-Axl), Axl-Fc de ratón (m-Axl) o Mer-Fc humano (h-Mer), Tyro-3-Fc (h-Tyro-3) durante 1 hora a 37 °C y se lavaron cuatro veces en PBST. Las placas se incubaron con los mAb anti-Axl (2 horas a 37 °C) y se lavaron cuatro veces en PBST. Las placas se incubaron con anti-IgG de ratón (Sigma) conjugado con HRP a una dilución de 1: 2000 en PBST, BSA al 1 % (1 hora a 37 °C). Finalmente, se añadió una solución de orto-fenilendiamina (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió la absorbancia a 450 nm.

25 Se demostró la especificidad contra h-Axl, de una manera específica de la dosis, de los diez mAb anti-hAxlECD seleccionados (Figura 1).

30 ***Ejemplo 2.2: El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón se une específicamente a células que expresan Axl según se determinó mediante FACS***

35 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón de la invención, para reconocer específicamente células que expresan Axl, se determinó mediante FACS usando técnicas estándar. Brevemente, se recogieron células A549 (número ATCC: CCL-185), se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón purificados de la invención a 4 °C durante 1 hora, se lavaron tres veces en PBS-BSA al 0,1 %, y después se tiñeron con anti-IgG de ratón (1: 50) (Sigma) conjugado con fluoresceína, a 4 °C en la oscuridad durante 45 min. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Tal como se muestra en la figura 2, los anticuerpos monoclonales anti-axl de ratón de la invención se unieron a células A549 que expresaban Axl específicamente.

40 ***Ejemplo 2.3: Medición de la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón evaluado mediante BIAcore***

45 Para la determinación de la afinidad de unión de los anticuerpos anti-Axl, se usó una medición de resonancia de plasmón superficial con un instrumento BIAcore-3000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de la plataforma de Proteomic Imaging and Molecular Interactions (M. Pugnère) situada en el laboratorio. Para medir la afinidad entre los anticuerpos anti-Axl y el hAxl-hFc, se capturaron anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón mediante microplacas biodetectoras CM5 revestidas con hAxl-hFc (usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore AB)). Para la medición de los parámetros cinéticos, se inyectaron varias concentraciones de mAb anti-Axl (de 2 a 133 nM) en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tampón de tensioactivo P20 al 0,005 % a 25 °C con un caudal de 50 μ l/min. Los índices de asociación (k_a) y los índices de disociación (k_d) se calcularon usando un modelo de unión Langmuir sencillo, individualizado (programa informático BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la relación k_d/k_a . Tal y como se indica (Figura 3A), El anticuerpo 3E3-E8 mostró una K_D de $1,6 \times 10^{-9}$ M.

55 **Ejemplo 3: El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón no bloquea la unión de Gas6**

60 Para un estudio de competición, se inyectó una concentración de saturación de Gas6 (625 nM) en microplacas biodetectoras CM5 revestidas con hAxl-hFc (usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore AB)). El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón (666 nM) se inyectó sin eliminar Gas6. Se llevó a cabo el mismo experimento inyectando en primer lugar el anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón (666 nM) y en segundo lugar Gas6 (625 nM). Los resultados mostraron que 3E3-E8 no competía con el ligando Gas6 por la unión con hAxlECD (Figura 3B).

Ejemplo 4: El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón de la invención inhibe la fosforilación de Axl inducida por ligando *in vitro*

65 Se llevaron a cabo experimentos de ELISA para investigar si el anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón de la invención tenía la capacidad de bloquear la fosforilación de Axl inducida por el ligando Gas6. En resumen, en un

medio de crecimiento normal, se sembraron células BXPC3 (número ATCC: CRL- 1687), Capan-1 (número ATCC: HTB-79), PANC1 (número ATCC: CRL-1469) y MIAPaCa-2 (número ATCC: CRL- 1420) en placas de 6 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento se sustituyó por medio sin suero para privar a las células durante la noche durante 24 horas. La células se preincubaron con 100 µg/ml de anti-Axl monoclonal de ratón purificado de la invención, y después se trataron con o sin Gas6 250 ng/ml incubado con Gas6 durante 30 min a 37 °C. A continuación, el medio se eliminó, las células se lisaron en 50 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % (v/v), glicerol al 10 % (v/v), fluoruro de sodio 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, ortovanadato sódico 1 mM (Sigma)) complementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) durante 30 min. Se eliminaron los desechos celulares mediante centrifugación y las concentraciones de proteínas se determinaron mediante la reacción colorimétrica de Bradford. El kit PathScan® Phospho-Axl (PanTyr) de ELISA de tipo sándwich (RD Systems, Minneapolis, MN) se usó según describió el fabricante para la detección del nivel de fosfo-Axl midiendo la absorbancia a 450 nm en un ensayo colorimétrico.

Tal como se muestra en la figura 4, en todas las líneas celulares de cáncer pancreático, el mAb 3E3-E8 inhibió fuertemente la fosforilación de Axl inducida por ligando Gas6. Otros mAb no inhibieron o inhibieron ligeramente la fosforilación de Axl inducida por ligando Gas6 en todas las líneas celulares de cáncer pancreático.

Ejemplo 5: El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón de la invención inhibe la migración celular

Se llevó a cabo un ensayo de cicatrización de heridas observando el proceso de cicatrización en el que las células en los bordes de la herida artificial migran hacia la zona de la herida. En placas de 24 pocillos, se cultivaron células A549 hasta la confluencia o casi la confluencia (>90 %). Se creó un campo de herida en el centro del pocillo usando una punta de pipeta estéril. Las células migratorias son capaces de extender protrusiones y finalmente de invadir y cerrar el campo de la herida. Las células se aclararon muy cuidadosamente con PBS y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón purificados de la invención (100 µg/ml) con o sin 100 µg/ml de Gas6. El índice de migración celular se determinó 24 horas después del tratamiento usando formación de imágenes microscópicas. Tal como se muestra en la figura 5, el mAb 3E3-E8 inhibió fuertemente la migración celular ya que la zona de cicatrización era todavía visible a diferencia de las células tratadas con mAb1 o Gas6.

Ejemplo 6: El anticuerpo monoclonal anti-Axl de ratón de la invención inhibe la proliferación celular

Células de cáncer pancreático MIAPaCa-2, Capan-1 y PANC1 se sembraron a 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón (25, 50 o 100 µg/ml) durante 5 días. Se realizaron ensayos de proliferación de celular usando el ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). El MTS se reduce por las células en un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo tisular. La absorbancia del formazán a 490 nm se midió usando un espectrofotómetro. Tal como se muestra en la figura 6, el mAb 3E3-E8 inhibió fuertemente la proliferación de las células pancreáticas mientras que con el otro anticuerpo específico de Axl (mAb1) se observó una ligera inhibición.

Ejemplo 7: El anticuerpo monoclonal anti-Axl humano de ratón de la invención regula negativamente la expresión de Axl e inhibe la ruta de akt

Para descifrar el mecanismo implicado en la inhibición de la migración celular y la fosforilación de Axl por el mAb 3E3-E8, se analizaron su efecto directo sobre el receptor de Axl y las rutas de señalización corriente abajo (se ha informado que la activación del receptor de Axl mediante el ligando Gas6 induce varias cascadas de señalización clave, en particular la ruta de AKT). La regulación negativa del receptor de Axl y la fosforilación del receptor de Axl y de Akt se analizaron mediante transferencia Western en una línea celular de células de cáncer pancreático (células Panc-1) tratada con el mAb 3E3-E8.

Una línea celular de cáncer de pancreático, células Panc-1, se colocaron en placas de 6 pocillos (1x10⁶ células por pocillo) y se incubaron con 100 ug/ml de 3E3-E8 a 37 °C. Las líneas celulares recogidas a diferentes puntos temporales se lisaron con tampón (NaCl 150 mM, TRIS 10 mM pH7,4, EDTA 1mM, TRITON X100 al 1 %) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, fluoruro de sodio 100 mM, ortovanadato sódico 10 mM y un comprimido de mezcla completa de inhibidores de proteasas (Sigma, St Louis, MO). Después de disolver en SDS-PAGE al 8 % o al 10 % en condiciones reductoras, las proteínas se transfirieron sobre membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA) que se saturaron después en PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % y leche en polvo desnatada al 5 %. Las membranas se incubaron durante una noche a 4 °C con diluciones apropiadas de anti-AXL humano (R&D systems), anti-fosfo-Axl (Y702) o anti-fosfo-Akt (S473) de Cell Signaling Technology. Las inmunotransferencias se normalizaron usando un anticuerpo dirigido contra GAPDH (Millipore). Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) y se procesaron para la detección de ECL (Amersham) y análisis con G: BOX iChemi (Syngene).

Cuando las células se trataron con el mAb 3E3-E8, la expresión de Axl disminuye rápidamente después de 90 minutos y es casi indetectable después de 24 horas (Figura 7A). Se observó una inducción de la cantidad de fosfo-Axl y fosfo-Akt cuando las células se estimularon con Gas6. Ambas señales se inhibieron drásticamente mediante

pretratamiento con el mAb 3E3-E8 (Figura 7B).

Ejemplo 8: El anticuerpo monoclonal anti-Axl humano de ratón de la invención, reduce el crecimiento *in vivo* del cáncer de mama triple negativo humano y del cancer pancreático asociado a la regulación negativa del receptor de axl

Todos los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en conformidad con las directrices francesas para estudios experimentales en animales (Acuerdo n.º C34-172-27). Se adquirieron ratones desnudos atímicos hembra de seis semanas de vida de Harlan. En el costado derecho de los ratones desnudos atímicos, se implantaron células de cáncer de mama triple negativo (5×10^6 ; MDA-MB-231; número ATCC: HTB-26) o células de carcinoma pancreático ($3,5 \times 10^6$, BXPC3; 5×10^6 , MIAPaCa-2). Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , los ratones portadores de tumores se asignaron al azar en distintos grupos de tratamiento. Los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales con vehículo (NaCl al 0,9 %) o solo con anticuerpos monoclonales anti-Axl de ratón de la invención a $300 \mu\text{g/inyección}$ (dos veces por semana durante 4 semanas consecutivas) o con gemcitabina (GEMZAR). Con un calibrador el volumen de los tumores se midió semanalmente. Los resultados para BXPC3 se expresaron también mediante una curva de supervivencia modificada de Kaplan-Meier, usando el tiempo que necesitó el tumor hasta alcanzar un volumen predefinido de 2.000 mm^3 . Un retraso medio se definió como el tiempo en el que el 50 % de los ratones tuvieron un tumor que alcanzó el volumen de 2.000 mm^3 . El mAb anti-hAxl, 3E3-E8, pero no el mAb1, disminuyó el crecimiento tumoral de MDA-MB-231 y de los xenoinjertos pancreáticos (Figura 8A, B, C). Cuando los ratones se trataron con el anticuerpo 3E3-E8, la curva modificada de Kaplan-Meier demostró un retraso de 15 días hasta alcanzar el 50 % de supervivencia, cuando se comparó con la de los ratones tratados con NaCl (Figura 8D).

En otra serie de experimentos, se explantaron xenoinjertos de MIAPaCa-2 tratados con el mAb 3E3-E8 o con el mAb de isotipo IgG1 murino irrelevante (Px), después de dos inyecciones de tratamiento con mAb, y se usaron para la detección por transferencia Western de receptores de Axl (mAb anti-Axl, R&D systems) o proteína de control GAPDH (anti-GAPDH, Millipore). El tratamiento con el mAb 3E3-E8 indujo una disminución notable de la expresión de Axl en los tumores (Figura 8E).

Ejemplo 9: El epítipo del anticuerpo monoclonal anti-Axl humano de ratón es un epítipo conformacional compuesto por 2 péptidos, uno localizado en el dominio 1 de la fibronectina 3 y otro en el dominio 2 de la fibronectina 3 de Axl humano

Para definir las estructuras del epítipo, se llevaron a cabo ensayos de proteólisis limitada de un complejo de anticuerpo/antígeno inmovilizado. Para mapear el epítipo de 3E3-E8, el hAxl-hFc se unió por afinidad al anticuerpo monoclonal 3E3-E8 inmovilizado en condiciones fisiológicas. Después, se llevó a cabo una serie de escisiones enzimáticas proteolíticas (serina proteasa Tripsina y endoproteinasa GluC) para eliminar los restos de hAxl-Fc que están desprotegidos por el 3E3-E8. Después de la elución, los restos protegidos, es decir, el epítipo de 3E3-E8, se identificaron basándose en sus pesos moleculares, según se determinó por el análisis MALDI-MS de los péptidos que se unieron por afinidad al anticuerpo inmovilizado.

El anticuerpo monoclonal 3E3-E8 ($250 \mu\text{g}$) se acopló a ProMag Magnetics Microsphere PMC3N (Bangs Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente de acuerdo con los procedimientos del proveedor. Se incubaron $50 \mu\text{g}$ de complejo de microperlas de 3E3-E8 con $50 \mu\text{g}$ del antígeno hAxl-hFc (R&D system) y se dejaron unirse durante 90 minutos a 4°C . El antígeno libre se eliminó mediante tres lavados con tampón. El complejo inmunitario de 3E3-E8 y hAxl-hFc se dirigió a 37°C con $0,35 \mu\text{g}$ de Tripsina o GluC durante 2h15. El sobrenadante se separó por centrifugación (2000 g , 4°C , 3 min) y se desechó. Las microperlas asociadas con los restos protegidos por 3E3-E8 y hAxl-hFc se lavaron tres veces con tampón. Se dejó proceder la disociación durante 40 min a temperatura ambiente usando TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1 %. Se obtuvieron espectros mediante espectrometría de masas MALDI (ABSCIEX MALDI 4800 con un Láser Nd/YAG a 355 nm , 200 Hz , 20 kV para la fuente de tensión, tiempo de extracción de 250 ns) con la suma de 1500 disparos láser. La matriz usada para la muestra fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) a 5 mg/ml . En la Figura 9 se muestra la composición de la secuencia del antígeno hAxl-hFc (R&D system) y la secuencia del epítipo del anticuerpo 3E3-E8 identificado. El anticuerpo monoclonal 3E3-E8 de ratón se une a un epítipo en conformación 3D compuesto por 2 péptidos, uno posicionado en el dominio 1 de la fibronectina de tipo III (secuencia: "NLHLVSR") y otro posicionado en el dominio 2 de la fibronectina de tipo III (secuencia: "VLMDIGLRQEVTLE").

Ejemplo 10: El epítipo del anticuerpo monoclonal anti-Axl humano de ratón se expone al área superficial del disolvente accesible y se localiza estructuralmente lejos del sitio de interacción de gas6

El modelo del dominio extracelular de la proteína Axl humana se construyó en 2 etapas. En primer lugar, los dominios de tipo inmunoglobulina (dominio 1 y 2) se extrajeron de la estructura cristalográfica disponible en el Protein Data Bank (banco de datos de proteínas) con el código 2C5D. Esta estructura representa un complejo de Axl/Gas6 en el que los dos dominios de tipo inmunoglobulina del ectodominio de Axl están entrecruzados por el primer dominio de tipo laminina G de Gas6. Desafortunadamente, los dos dominios de Axl de fibronectina de tipo III (FN3) todavía no se han cristalizado, y por lo tanto necesitaron ser modelizados. El modelo se construyó mediante

5 modelado por homología usando como molde la estructura 3D de FN3 en tándem A77-A78 desde la cadena A de la proteína titina humana (id. de PDB: 3LPW). Después del alineamiento, las secuencias de las dos proteínas comparten una identidad del 22,8 %. Finalmente, los dominios de tipo inmunoglobulina y los dominios de fibronectina de tipo III se enlazaron entre sí entre la leucina 224 y la prolina 225, modificando los ángulos diedros para minimizar el impedimento estérico entre las cadenas laterales de los dos dominios.

10 El epítipo del anticuerpo anti-Axl de ratón, 3E3-E8, así como los dominios de unión a Gas6 se identificaron después en este modelo del ectodominio completo de Axl humano. Este modelo demuestra la localización específica de los dos sitios antigénicos localizados en la superficie reconocidos por 3E3-E8 en Axl (Figura 10). Este modelo demostró también que el epítipo de 3E3-E8, compuesto por los 2 péptidos (el primero en el dominio 1 de FN3 y el segundo en el dominio 2 de FN3 de Axl), está localizado lejos del sitio de unión al ligando (sitio de unión a Gas6 que está localizado en el dominio 1 de tipo IgG) de acuerdo con los estudios de competición realizados (ejemplo 3; Figura 3B).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM
ORIBASE PHARMA

20 <120> ANTICUERPOS ANTI-AXL Y USOS DE LOS MISMOS

<130> BIO11082 ROBERT / MC

25 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

30 <210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> cadena VH

<400> 1

ES 2 677 367 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

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

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

Arg Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> H-CDR1
 <400> 2

Asn Tyr Ala Val His
 1 5

15 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> H-CDR2
 <400> 3

25 Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

30 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 677 367 T3

<220>
 <223> H-CDR3
 <400> 4
 5 Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Tyr Pro Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> cadena VL
 15
 <400> 5
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 20 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> L-CDR1
 <400> 6
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 30 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> L-CDR2
 40 <400> 7

ES 2 677 367 T3

Arg Met Ser Asn Leu Ala
1 5

5 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> L-CDR3
<400> 8

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

15 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> epitopo FN3D1
<400> 9

Asn Leu His Leu Val Ser Arg
1 5

30 <210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> epitopo FN3D2
<400> 10

Val Leu Met Asp Ile Gly Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu
1 5 10

40 <210> 11
<211> 652
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> hAxl-hFc
<400> 11

ES 2 677 367 T3

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
 20 25 30

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
 35 40 45

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
 50 55 60

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

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
 85 90 95

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
 100 105 110

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
 115 120 125

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
 130 135 140

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
 145 150 155 160

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
 165 170 175

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu

ES 2 677 367 T3

			180						185						190		
Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu		
		195					200					205					
Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr		
	210					215					220						
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln		
225					230					235					240		
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser		
				245					250					255			
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro		
			260					265					270				
Tyr	His	Ile	Arg	Val	Ala	Cys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Trp		
		275					280					285					
Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro		
	290					295					300						
Pro	Glu	Asn	Ile	Ser	Ala	Thr	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Phe	Val	His		
305					310					315					320		
Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg		
				325					330					335			
Leu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly		
			340					345					350				
Leu	Arg	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ser		
		355					360					365					
Asn	Leu	Thr	Val	Cys	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro		
	370					375						380					
Trp	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ala	Trp	Arg	Pro	Val	Lys	Glu	Pro		
385					390					395					400		
Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro		
				405					410					415			
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
			420					425					430				
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
		435					440					445					

ES 2 677 367 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 610 615 620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys His His His His His His
 645 650

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por Axl o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1, SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1, SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3, en el que dicho anticuerpo se une al dominio extracelular de Axl en la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 10.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 5.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, en el que la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 5.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 4 que es un anticuerpo quimérico, preferentemente un anticuerpo quimérico humano/de ratón.
- 30 6. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 que es un anticuerpo humanizado.
- 35 7. Un fragmento de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
- 40 8. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. El anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un fármaco.
13. El anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas asociadas con la sobreexpresión de Axl.
14. El anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el diagnóstico de enfermedades cancerosas asociadas con la sobreexpresión de Axl.

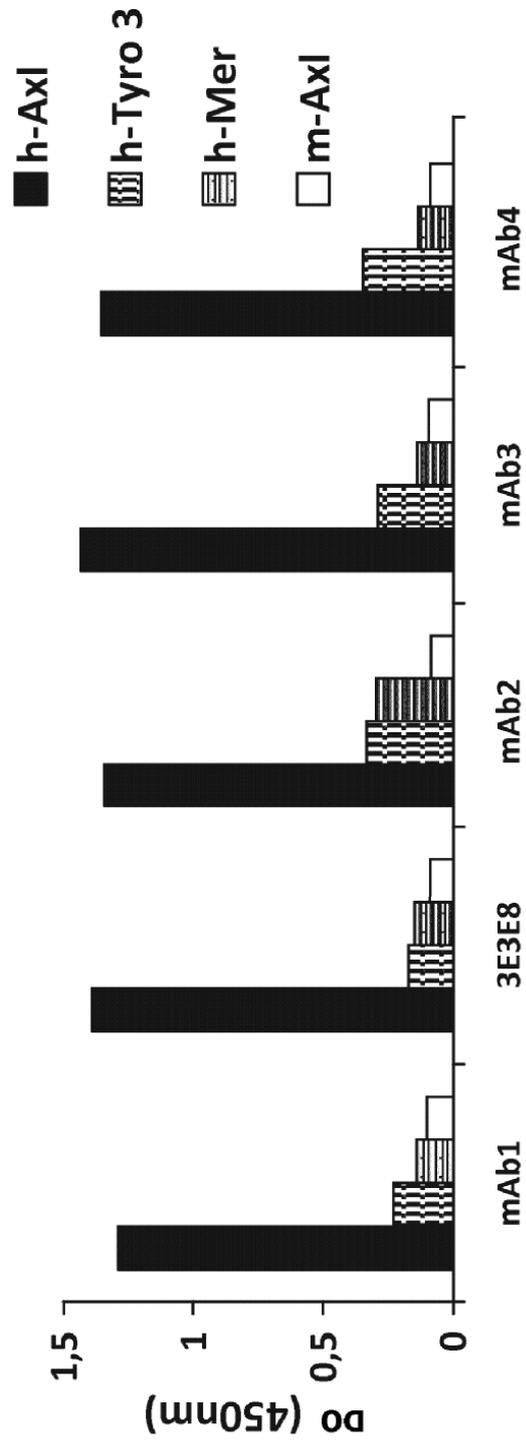


Figura 1

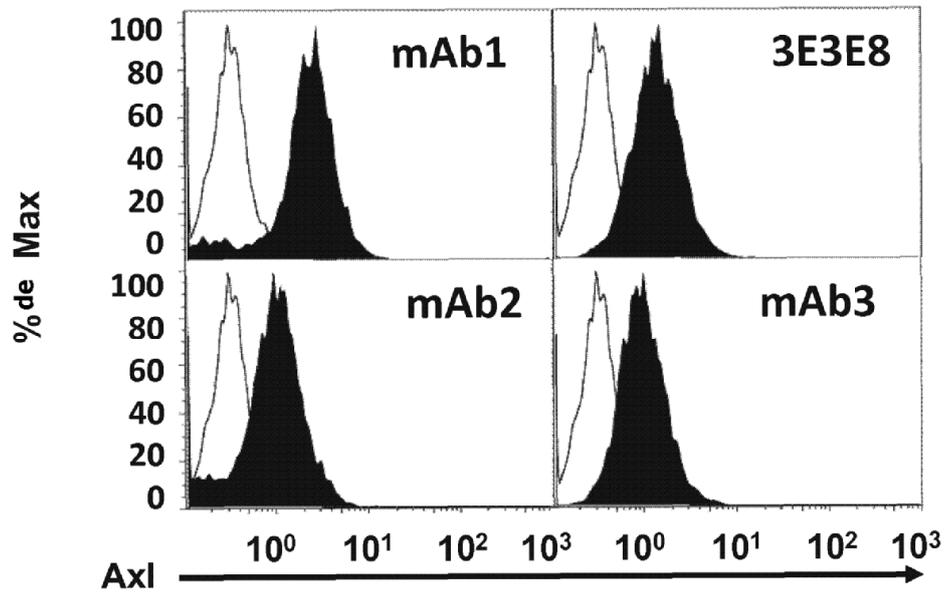


Figura 2

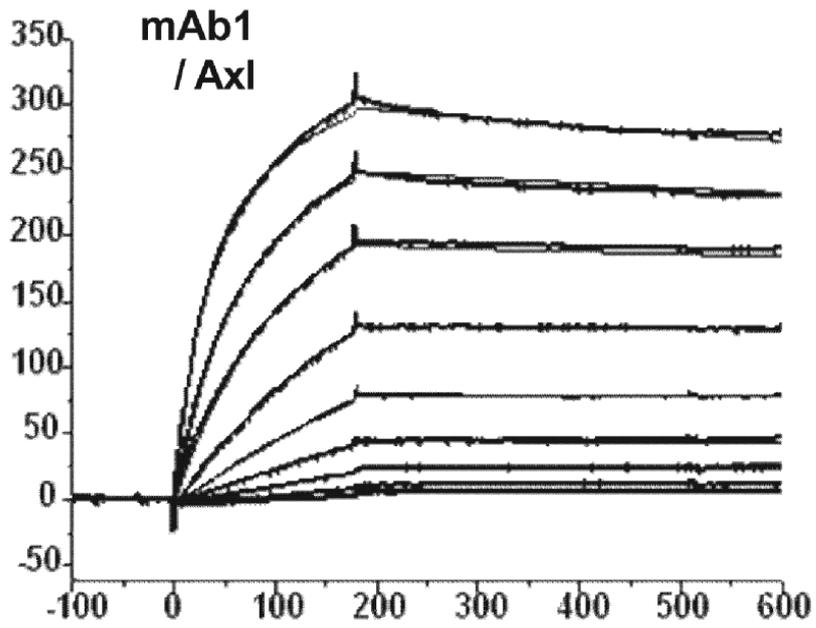
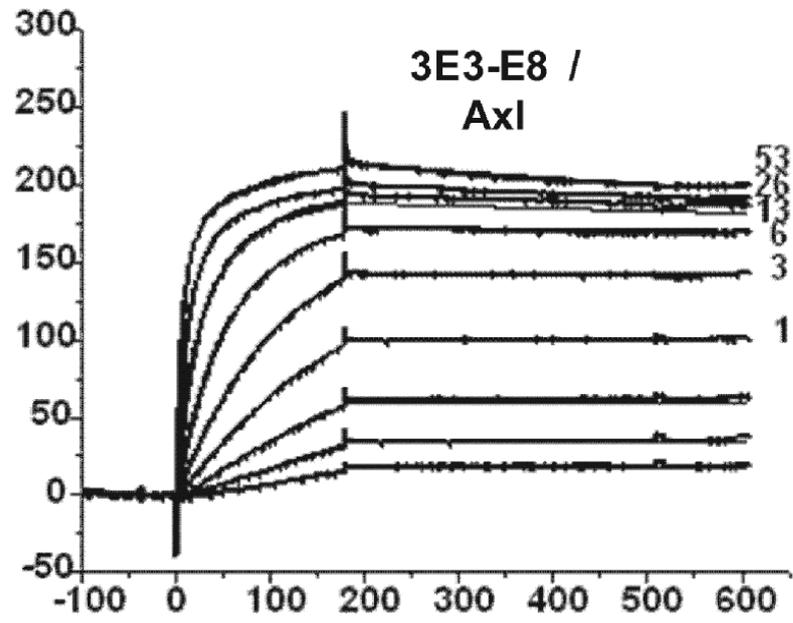


Figura 3A

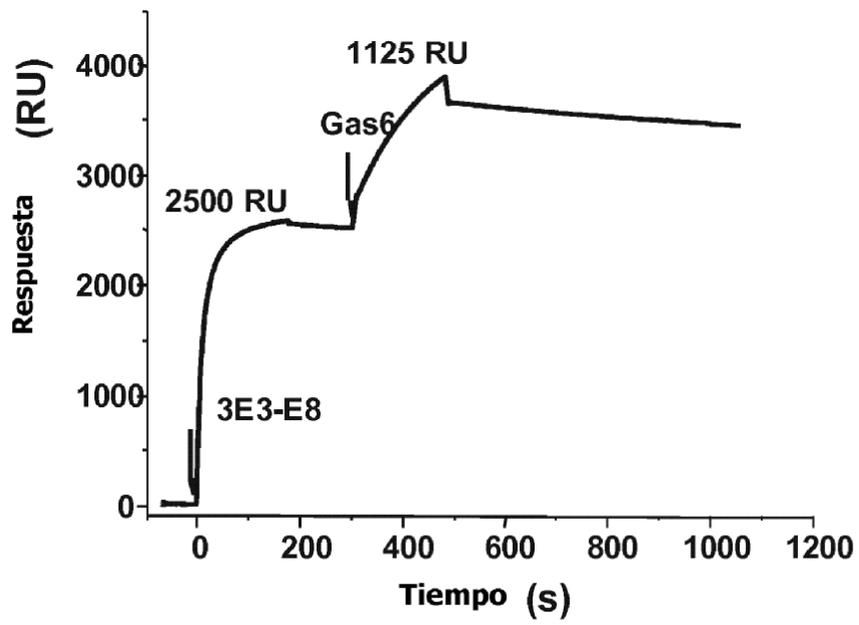
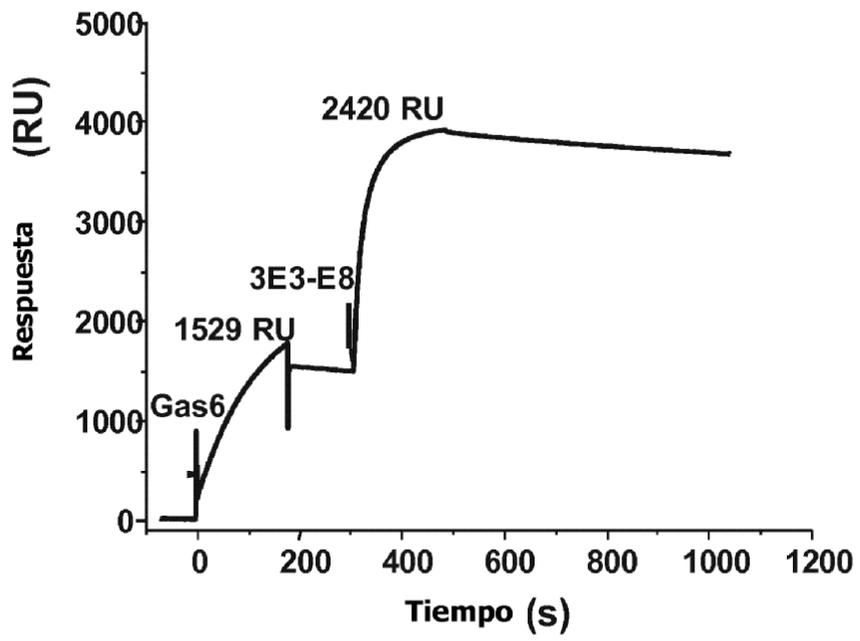


Figura 3B

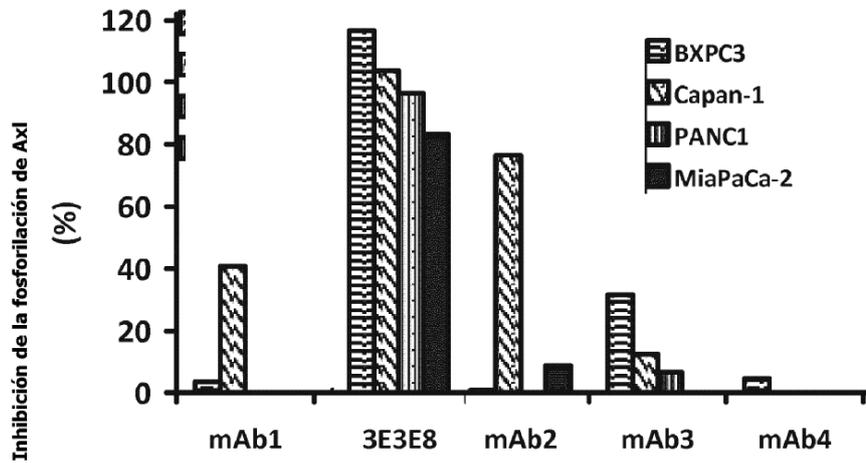


Figura 4

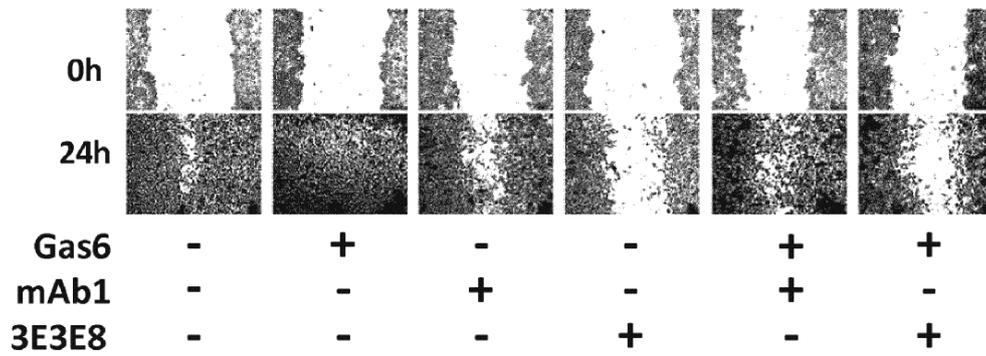


Figura 5

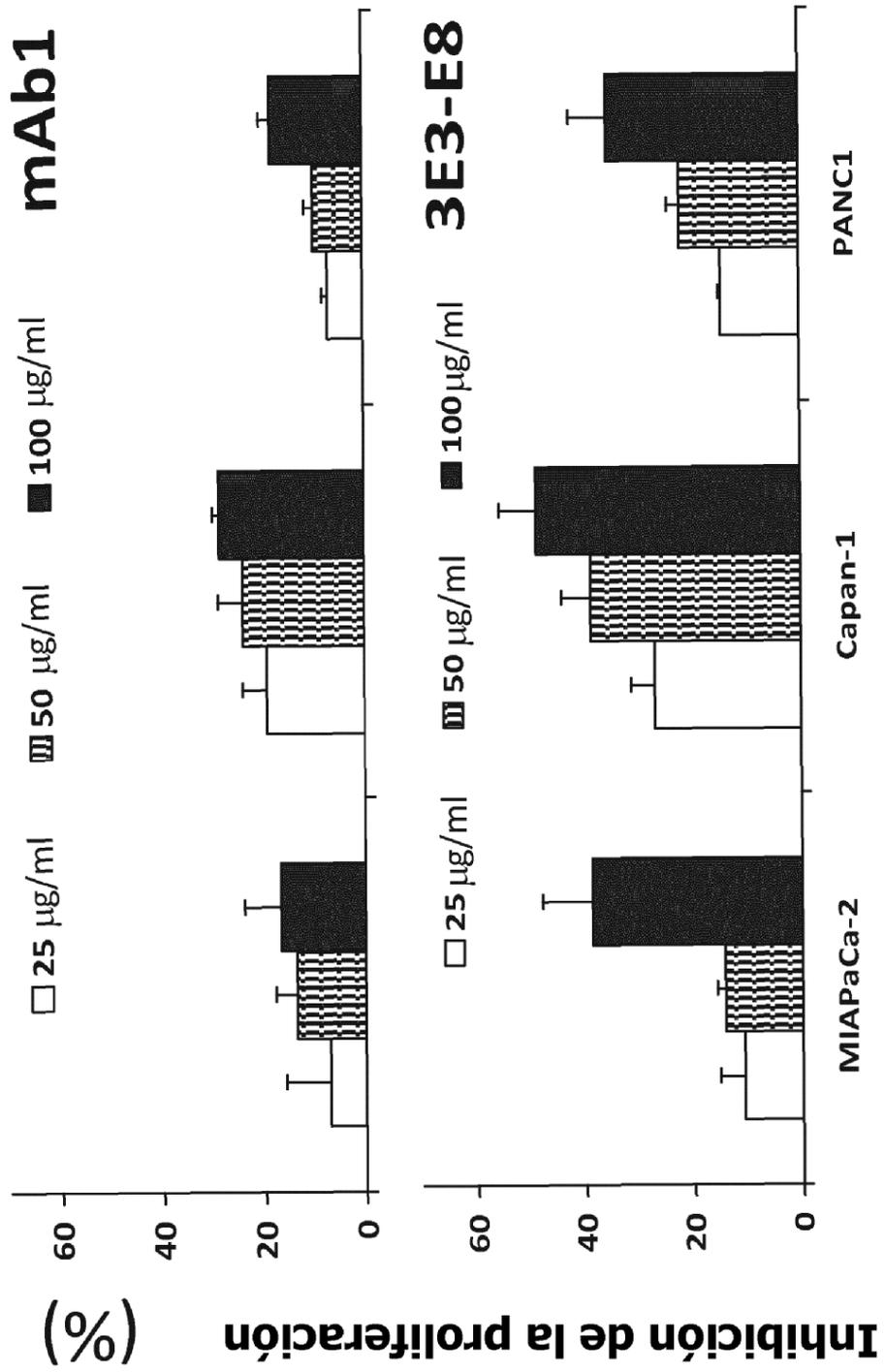


Figura 6

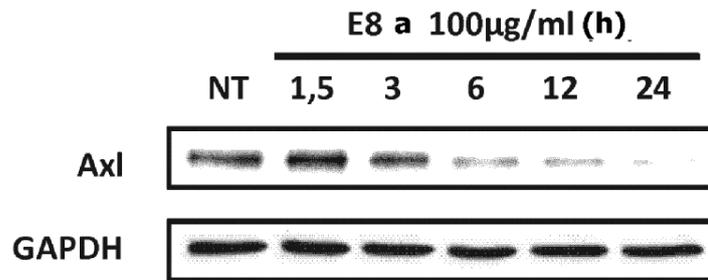


Figura 7A

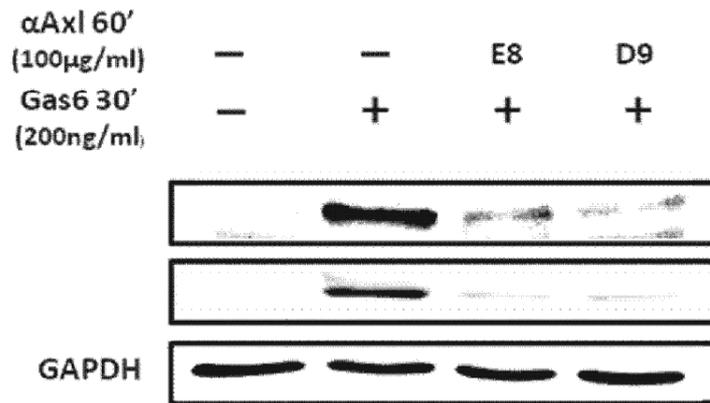


Figura 7B

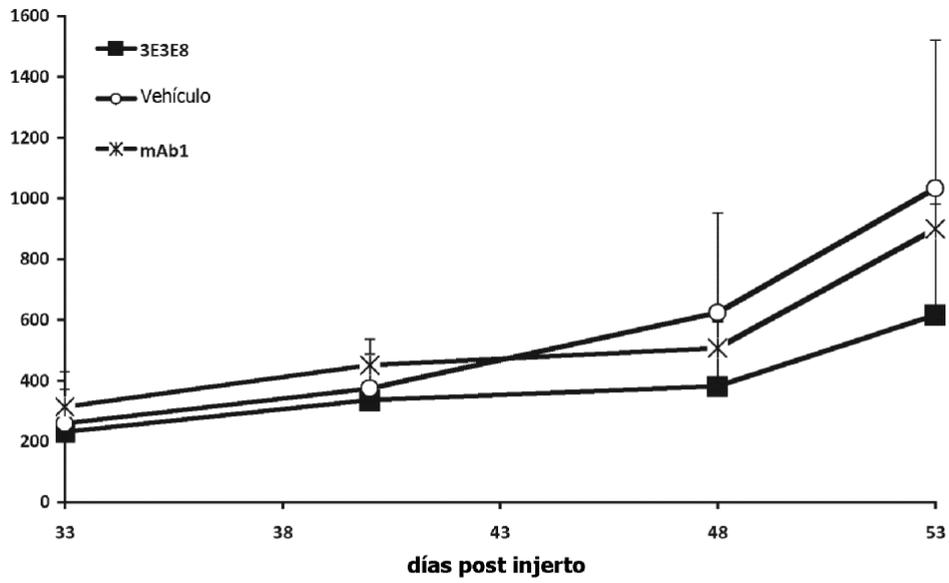


Figura 8A

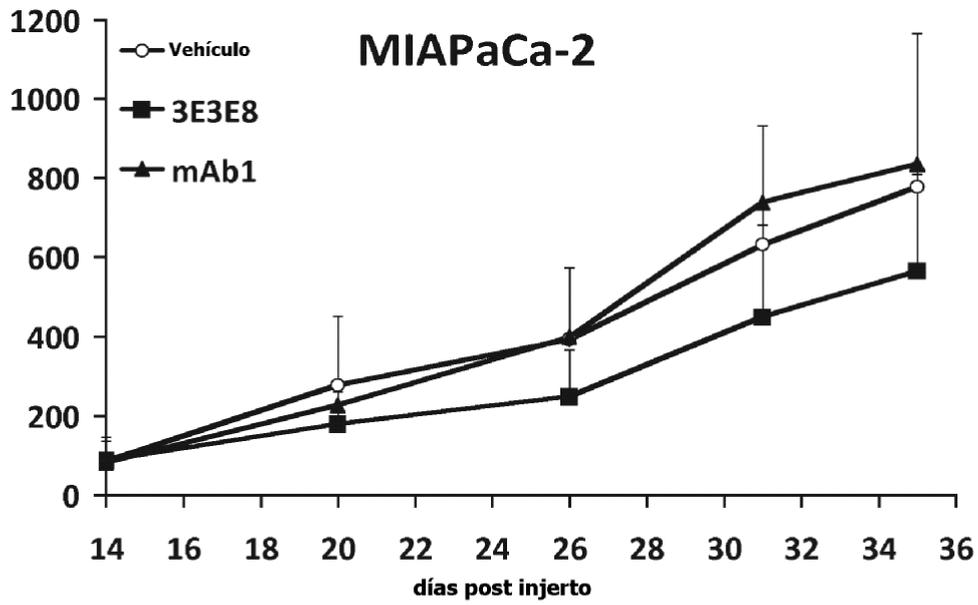


Figura 8B

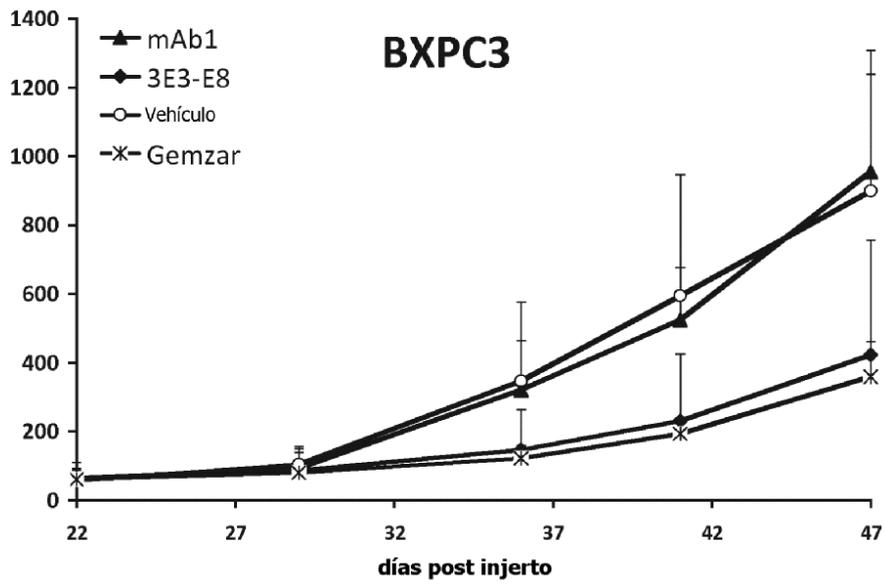


Figura 8C

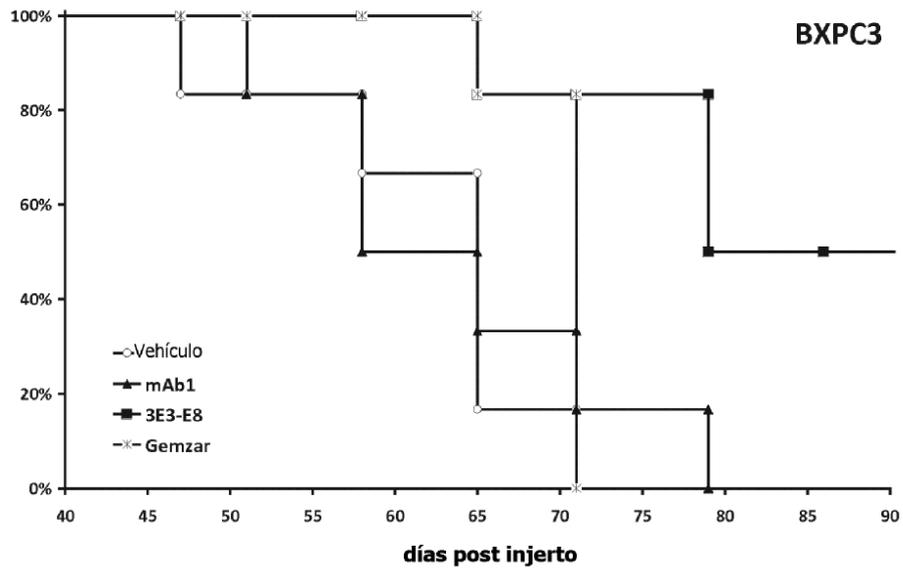


Figura 8D

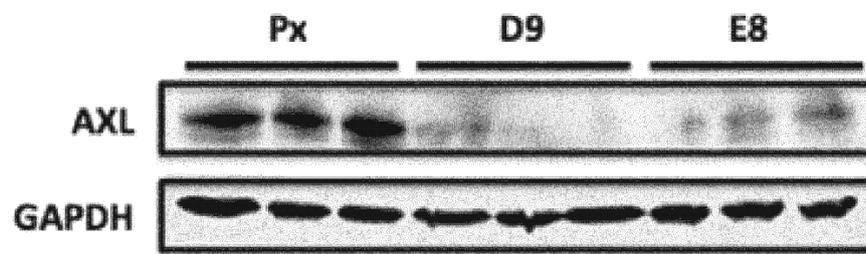


Figura 8E

Composición de hAxI-hFc			
AxI humano (Glu33-Pro440)	DIEGRMD	IgG1 humana (Pro100-Lys330)	etiqueta de 6 His

33

EESEPFVGN PGNITGARGL TGTLRQOLQV QGEPPEVHML RDGQILELAD STQTVPLGE DEQDDWIVVS QLRITSLQLS

dominio 1 de tipo

DTGQYQCLVF LGHQTFVSQP GYVGLGLPY FLEEPEDRTV AANTPENLSC QAQGPEPEVD LMLQDAVPL ATAPGHGPQR

dominio 2 de tipo

SLHVPGLNKT SSFSCFAHNA KGVTTSTRAT ITVL PQQPKN LHLVSRQPTL LEVAWTPGLS GIYPLTHCTL QAVLSNDGMG

dominio 1 de FNIII

IQAGEPDPE EPLTSQASVP PHQLRLGSLH PTPYHIRVA CTSSQGPSSW THWLPVETPE GYPLGPPENI SATRNGSQAF

VHWQEPRAPL QGTL LGYRLA YQGQDTPHVL MDIGLRQEVTL LFLQGDGSSV NLTVCVAAYT AAGDGPWSLP VPLFAWRPVK

440

dominio 2 de FNIII

EPSTPAFSWP DIEGRMDPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPKPKD TIMISRTPEV TCWVVDVSH EPEVKFNWYV

DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDELT

KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVL DSDGSFLLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK

SLSLSPGKHH HHHH

Epítopo 3E3-E8	NLHLVSR (FNIII-1: 230-236)	VLMDIGLRQEVTL (FNIII-2: 379-392)
-------------------	----------------------------	----------------------------------

Figura 9

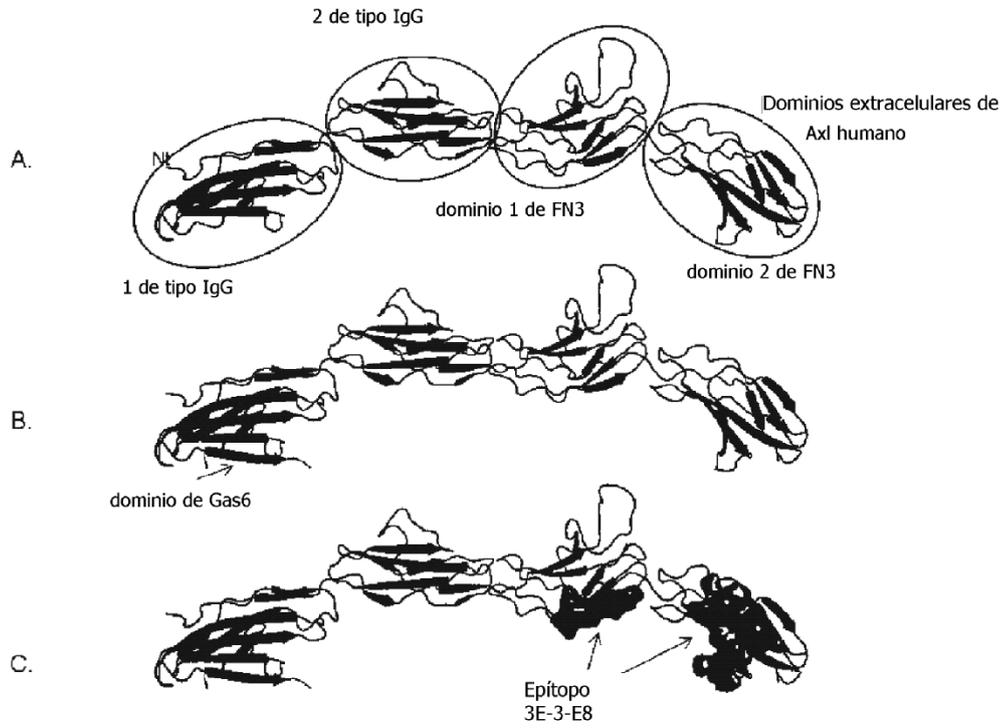


Figura 10