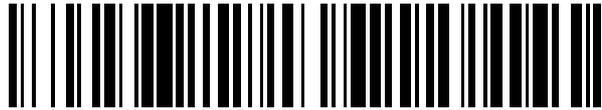


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 736**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/40	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/EP2012/062114**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175691**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12729603 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2723376**

54 Título: **Anticuerpos anti-Axl y sus usos**

30 Prioridad:

22.06.2011 EP 11305793
04.07.2011 US 201161504258 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2019

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 2 712 736 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 sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Axl y sus usos en métodos diagnósticos y terapéuticos.

10 **Antecedentes de la invención**

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

25 La desregulación de Axl o su ligando Gas6 están implicada en la patogénesis de una diversidad de cánceres humanos. Se ha publicado que la sobreexpresión de Axl en una amplia serie de cánceres humanos (de pulmón, próstata, mama, gástrico, pancreático, de ovario, tiroides, cánceres sanguíneos, carcinoma celular renal así como glioblastoma...) y está asociada con la invasividad, metástasis y prognosis negativa. Estos descubrimientos sugieren que Axl puede estar implicada en la regulación de múltiples aspectos de la tumorigénesis incluyendo el crecimiento, invasión y angiogénesis tumoral y, por tanto, representa un objetivo para la intervención terapéutica en cáncer
30 especialmente para el desarrollo de terapia anti-cáncer metastático y para otro tratamiento de cáncer múltiple incluyendo el tratamiento de la resistencia a fármaco.

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

Otros papeles de Axl dependientes o no de sus ligandos tales como la inhibición de las funciones inmunes, la activación de la agregación de plaquetas y las inductoras de la infección vírica (como ejemplo, la absorción del virus del Ébola y Lassa es fomentada por Axl) destacan el potencial de Axl como objeto terapéutico para otras
40 aplicaciones distintas de la oncología.

Compendio de la invención

45 La presente invención está definida en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por Axl, comprendiendo 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 las SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

50 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones:

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

El término "anticuerpo anti-Axl" se refiere a un anticuerpo dirigido a Axl.

60 Según la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tiene el mismo significado, y se usará igualmente en la presente invención. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Por definición, el término anticuerpo abarca no solamente las moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos del anticuerpo así
65 como variantes (incluyendo derivados) de los anticuerpos y los fragmentos del anticuerpo. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están ligadas una con otra por enlaces disulfuros y cada cadena pesada está ligada a una

cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (1) y kappa (k). Hay cinco clases de cadena pesada principales (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA y 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, colectivamente referidos como CH). Las regiones variables de tanto las cadenas ligeras (VL) como las pesadas (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como la asociación de cadena de anticuerpo, secreción, movilidad transplacental, unión complemento, y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las partes variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación al anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación con el anticuerpo están compuestos de restos que principalmente son de regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los restos de las regiones no hipervariables o estructurales (FR) influyen en la estructura de dominio completa y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativo. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, comprendiendo el conjunto de CDR de cada una de la región V de una cadena pesada y una ligera. Las regiones estructurales (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo 20G7-D9, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

Según la invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene la región estructural variable y regiones constantes de un anticuerpo humano pero retiene las CDR del anticuerpo 20G7-D9.

El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente una mitad del extremo N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, se unen juntas 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 a antígeno, el cual es ligeramente mayor que el Fab unido por un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando 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 a antígeno, el cual se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL covalentemente ligado que normalmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes codificantes de VH y VL ligados por un codificante péptido conector. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes se pueden formar cualquiera de los dos espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o se pueden generar acoplando scFv monovalentes por un péptido conector, tal como sc(Fv)₂ divalente.

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

Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se refiere a un anticuerpo según la invención o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado" como se usa en el presente documento preferiblemente quiere decir que está presente al menos el 75 % en peso, más preferiblemente al menos 85 % en peso, más preferiblemente aún al menos 95 % en peso, y lo más preferiblemente al menos 98 % en peso, de las macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está básicamente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de manera perjudicial a las características básicas de la composición.

Anticuerpos de la invención:

La presente invención proporciona anticuerpos anti-Axl aislados o sus fragmentos. En particular, los inventores han

planteado un anticuerpo anti-Axl murino (20G7-D9) que produce hibridoma. Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligeras y pesadas de dicho mAb 20G7-D9 y, por tanto, han determinado el dominio de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla 1:

5

Dominios de mAb 20G7D9	Secuencia
VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKMSCKAAGYTFSSYWIEWVRQRP GH GLEWIGEIFPGSDSTNYNEKFNDRAFTADTSSNTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARPLYYGSSAWFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:1)
H CDR1	SYWIE (SEQ ID NO:2)
H CDR2	EIFPGSDSTNYNEKFND (SEQ ID NO:3)
H CDR3	PLYYGSSAWFAY (SEQ ID NO:4)
VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLTWYQQKQRKSPQ LLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYCQH HYATPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:5)
L CDR1	RASENIYSYLT (SEQ ID NO:6)
L CDR2	NAKTLA (SEQ ID NO:7)
L CDR3	QHHYATPWT (SEQ ID NO:8)

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

10

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

15

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

20

En particular, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-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.

25

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

30

En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo de ratón/humano quimérico. En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano puede comprender los dominios variables del anticuerpo 20G7-D9 como se definieron anteriormente.

35

En otra realización, el monoclonal de la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones estructurales aceptadoras humanas, y opcionalmente el dominio constante humano donde está presente, y CDR donantes no humanas, tales como CDR de ratón como se definieron anteriormente.

40

La invención proporciona además fragmentos anti-Axl dirigidos a Axl de dichos anticuerpos que incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

La invención proporciona además anticuerpo o fragmentos de anti-Axl que se unen a las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 en la parte extracelular de Axl.

mAb 20G7-D9	Secuencia de Axl humana (epítipo)
Dominio 2 tipo IgG	TSSFSCEAHNAK (SEQ ID NO:9)
Dominio 1 de FN3	GMGIQAGEPDPPEE (SEQ ID NO:10)
Dominio 2 de FN3	TPEVLMDIGLRQE (SEQ ID NO:11)

- 5 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.

Métodos de producción de los anticuerpos de la invención:

- 10 Los anticuerpos Anti-Axl de la invención se pueden producir por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, o bien sola o en combinación.

- 15 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica fácilmente puede producir dichos anticuerpos, por técnicas estándar para la producción de los polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar usando el método bien conocido de la fase sólida, preferiblemente usando un aparato de síntesis peptídica comercialmente disponible (tal como el producido por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en los vectores de expresión y la introducción de tales vectores en hospedadores eucariotas y procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales se pueden aislar más tarde usando técnicas bien conocidas.

- 25 Por consiguiente, un objetivo adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifican 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.

- 30 Generalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, la cual se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector vírico.

- Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" quieren decir el vehículo por el que se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y fomentar la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

- 35 Así, un objetivo adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

- Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para la célula animal incluyen promotor y potenciador temprano de SV40 (Mizukami T. y col. 1987), promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y y col. 1987), promotor (Mason JO y col. 1985) y potenciador (Gillies SD y col. 1983) de la cadena H de la inmunoglobulina y similares.

- 45 Se puede usar cualquier vector de expresión para la célula animal, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifica la región C del anticuerpo humano. Ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H y col. 1990), pAGE103 (Mizukami T y col. 1987), pHSG274 (Brady G y col. 1984), pKCR (O'Hare K y col. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H y col. 1990) y similares.

- 50 Otros ejemplos de plásmidos incluyen los plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcADN, pBR y similares.

- Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, del virus del herpes y vectores de AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir por técnicas conocidas en la técnica, tales como por transfección de células de empaquetamiento o por transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para la producción de tales virus recombinantes deficientes en replicación, 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.

- 60 Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que se ha sometido a transfección, infectado o transformado por un ácido nucleico y/o un vector según la invención.

El término "transformación" quiere decir la introducción de un gen "foráneo" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN a una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, generalmente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. Una célula hospedadora que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado".

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" quiere decir una célula hospedadora y vector compatible bajo condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN foráneo portado por el vector e introducido a la célula hospedadora.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plásmidos, células hospedadoras de insecto y vectores de Baculovirus, y células hospedadoras y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, célula procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células mamíferas, células de insecto, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos incluyen *E. coli*, Levaduras de *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares mamíferas (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen la célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), célula CHO en la que un gen de deshidrofolato reductasa (más adelante referido como "gen de DHFR") es defectuoso (Urlaub G y col.; 1980), célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, más adelante referida como "célula YB2/0"), y similares.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo según la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como 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 expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células hospedadoras recombinantes se pueden usar para la producción de anticuerpos de la invención.

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

- (i) cultivar el hibridoma 20G7-D9 bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo 20G7-D9;
- y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencional tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía por 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 previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolas en un vector de expresión para la célula animal que tiene genes que codifican CH del anticuerpo humano y CL del anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

Como dominio de CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenece a la inmunoglobulina humana, pero aquellos de clase IgG son adecuados y también se puede usar uno cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. También, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y se pueden usar aquellas de la clase kappa o la clase lambda.

Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica son bien conocidas en la técnica (Véase Morrison SL y col. (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 los dominios de CDR, como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolas en un vector de expresión para la célula animal que tiene genes que codifican (i) una región constante de la cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de la 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 del anticuerpo humanizado puede ser o bien de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada del anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera del anticuerpo existe en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Respecto a la facilidad de

construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en las 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 del anticuerpo humanizado del tipo tándem (Shitara K y col., 1994). Ejemplos del vector de expresión del anticuerpo humanizado tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados basados en el ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica son bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Riechmann L. y col. 1988; Neuberger MS y col, 1985). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes americanas N.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM y col. (1994); Roguska MA. y col. (1994)), e intercambio de cadena (patente americana N.º 5.565.332). También se conoce la tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales 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, papaína. También, el Fab se puede producir insertando ADN que codifica 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 (como 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, pepsina. También, el F(ab')₂ se puede producir uniendo el Fab' descrito más adelante por un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

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

El scFv de la presente invención se puede producir obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL como se ha descrito previamente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN dentro de un vector de expresión para procariota, o un vector de expresión para eucariota y, a continuación, introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (como sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, se puede usar una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, la cual implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a partir de un fragmento scFv donante, e injertarlas sobre una región estructural del fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, por ejemplo, los documentos WO98/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Se contempla(n) modificación(es) de secuencia 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 un anticuerpo humanizado se produce injertando simplemente solamente las CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de la VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácido de la VH y VL del anticuerpo no humano, no solamente en CDR sino en FR, están directamente o indirectamente asociados con la actividad de unión a antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos restos de aminoácido con diferentes restos de aminoácido derivados de las FR de la VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en los anticuerpos injertados con CDR humana, los intentos tienen que ser realizados para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la VH y VL de los anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que está directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interacciona con un resto de aminoácido de CDR, o que conserva la estructura tridimensional del anticuerpo y que está directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad de unión a antígeno reducida se podría incrementar reemplazando los aminoácidos identificados con los restos de aminoácido del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Las modificaciones y los cambios se pueden realizar en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifica, y todavía obtienen una molécula funcional que codifica un anticuerpo con las características deseables.

En la realización de los cambios en las secuencias amino, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conceder la función biológica interactiva sobre una proteína es en general entendida en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo de los aminoácidos contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, la cual poco a poco define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se ha asignado un índice hidropático según su hidrofobicidad y características de carga estos son: 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).

5 Un objetivo adicional de la presente invención también abarca las variantes conservadoras de la función de los anticuerpos de la presente invención.

10 Las "variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación general y la función del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, reemplazamiento de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión a hidrógeno, ácidas, básicas, hidrófobas, aromáticas, y similares). Los aminoácidos distintos a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de manera que el porcentaje de similitud de proteína o secuencia de aminoácidos entre cualquiera de las dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % determinado según un esquema de alineamiento tal como por el método de agrupamiento, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos 60 % de identidad de aminoácidos determinado por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, e incluso más preferiblemente al menos 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o básicamente similares que la proteína nativa o parental con la que se compara.

20 Dos secuencias de aminoácidos son "básicamente homólogas" o "básicamente similares" cuando más del 80 %, preferiblemente más del 85 %, preferiblemente más del 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente 90 %, preferiblemente más del 95 %, son similares (funcionalmente idénticas) por toda la longitud de la secuencia más corta. Preferiblemente, 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 de GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencia tales como BLAST, FASTA, etc.

30 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, mientras que no obstante obtienen una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que se pueden realizar diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

35 Se conoce en la técnica que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía dan como resultado una proteína con similar actividad biológica, es decir, todavía obtienen una proteína funcionalmente equivalente biológica.

40 Como se perfiló anteriormente, las sustituciones de aminoácidos, por lo tanto, en general se basan en la relativa similitud de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Sustituciones ilustrativas que toman diversas de las anteriores características en consideración son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

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

- 50 - una H-CDR1 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:2,
- una H-CDR2 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:3,
- una H-CDR3 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:4,
- una L-CDR1 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:6,
- una L-CDR2 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:7,
- 55 - una L-CDR3 que tiene al menos 90 % o 95 % de identidad con la secuencia expuesta como SEQ ID NO:8, y
- que se une específicamente a Axl con básicamente la misma afinidad que un anticuerpo que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende la SEQ ID NO:2 para H-CDR1, la SEQ ID NO:3 para H-CDR2 y la SEQ ID NO:4 para H-CDR3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende la SEQ ID NO:6 para L-CDR1, la SEQ ID NO:7 para L-CDR2 y la SEQ ID NO:8 para L-CDR3, y más preferiblemente con básicamente la misma afinidad que el anticuerpo anti-Axl murino 20G7-D9.

60 Por consiguiente, la invención también proporciona un anticuerpo que se une al dominio 2 tipo inmunoglobulina, dominio 1 de FN3 y dominio 2 de FN3 de la parte extracelular de Axl (secuencias de aminoácidos de epítipo de Axl SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11).

65 Dichos anticuerpos se pueden analizar para la unión específica por cualquier método conocido en la técnica. Muchos formato(s) de ensayo de unión competitivo diferente se pueden usar para la preclasificación (*binning*) de

epítipo. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivo que usan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos con precipitina de difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, y ensayos de fijación de complemento. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 5 1994 *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York). Por ejemplo, el BIACORE® (GE Healthcare, Piscaataway, NJ) es uno de una diversidad de formatos de ensayo de resonancia por plasmones superficiales que se usan de manera rutinaria para paneles de preclasificación de epítipo de anticuerpos monoclonales. Además, se pueden realizar los ensayos de bloqueo cruzado rutinarios tales como aquellos descritos 10 en "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988.

Los anticuerpos modificados por ingeniería de la invención incluyen aquellos en los que las modificaciones se han realizado a restos de la región estructural dentro de la VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Generalmente tales modificaciones de la región estructural se realizan para disminuir la inmunogenicidad 15 del anticuerpo. Por ejemplo, un planteamiento es "retromutar" uno o más restos de la región estructural a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a mutación somática puede contener restos de la región estructural que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar comparando las secuencias de la región estructural del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Para volver las secuencias de 20 la región estructural a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden estar abarcados por la invención. Otro tipo de modificación de la región estructural implica la mutación de uno o más restos dentro de la región estructural, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para separar los epítopos del linfocito T para de ese modo reducir la inmunogenicidad 25 potencial del anticuerpo. Este planteamiento también se refiere como "desinmunización" y se describe a más detalle en la publicación de patente americana N.º 20030153043 de Carr y col.

Además de o alternativamente a las modificaciones realizadas dentro de las regiones estructurales o CDR, los anticuerpos de la invención se pueden modificar por ingeniería para incluir modificaciones dentro de la región Fc, 30 generalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida del suero, fijación del complemento, unión a receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, se puede modificar químicamente un anticuerpo de la invención (por ejemplo, se puede unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describen a más detalle más adelante. La 35 numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CHI se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región bisagra está alterada, por ejemplo, incrementada o disminuida. Este planteamiento se describe más en el 40 documento de patente americana N.º 5.677.425 de Bodmer y col. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CHI está alterada, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, se muta la región bisagra de Fc de un anticuerpo para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región interfaz del 45 dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de modo que el anticuerpo ha alterado la unión de la proteína A estafilocócica (SpA) en relación con la unión de SpA dominio bisagra de Fc. Este planteamiento se describe a más detalle en el documento de patente americana N.º 6.165.745 de Ward y col.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para incrementar su semivida biológica. Diversos planteamientos son 50 posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en el documento de patente americana N.º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para incrementar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CL o CHI para contener un epítipo de unión a receptor salvaje tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las 55 patentes americanas N.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta y col.

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido con un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, un o más aminoácidos se 60 pueden reemplazar con un diferente resto de aminoácido de modo que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este planteamiento se describe a más detalle en las patentes americanas N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter y col.

En otra realización, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácido con 65 un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tiene la unión a C1q alterada y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o suprimida. Este planteamiento se describe a más detalles en la

patente americana N.º 6.194.551 de Idusogie y col.

En otra realización, se alteran uno o más restos de aminoácido para de ese modo alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este planteamiento se describe más en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer y col.

En otra realización más, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc modificando uno o más aminoácidos. Este planteamiento se describe más en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión sobre IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. y col., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:6.591-6.604, el documento WO2010106180).

En otra realización más, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden conseguir, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región estructural variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal planteamiento se describe a más detalle en las patentes americanas N.º 5.714.350 y 6.350.861 de Co y col.

Además o alternativamente, se puede producir un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tiene cantidades reducidas de o no tiene restos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac de bisección incrementadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterada incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedante con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang y col. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, el cual codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en tal línea celular presentan hipofucosilación o están desprovistos de restos fucosilo. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la invención se pueden producir por expresión recombinante en una línea celular la cual presenta patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una línea celular mamífera con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), dando como resultado también la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase, también, Shields, R.L. y col., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26.733-26.740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana y col. describe líneas celulares modificadas por ingeniería para expresar glicosil transferasas modificantes de glicoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería presentan estructuras GlcNac de bisección incrementadas que dan como resultado actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana y col., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180). Eureka Therapeutics describe además células mamíferas CHO modificadas por ingeniería genética capaces de producir anticuerpos con patrón de glicosilación de mamífero alterada desprovisto de restos fucosil (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos modificados por ingeniería para el patrón de glicosilación tipo mamífero y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla por la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede someter a pegilación para, por ejemplo, incrementar la semivida biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo. Para someter un anticuerpo a pegilación, el anticuerpo, o fragmento del mismo, generalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG llegan a estar unidos al anticuerpo o fragmento del anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que se han usado para someter a derivatización otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a someterse a pegilación es un anticuerpo anglicosilado. Los métodos para pegilación de proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP O 154 316 de Nishimura y col. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa y col.

Otra modificación de los anticuerpos que es contemplada por la invención es un conjugado o una fusión proteica de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención con proteína de suero, tal como albúmina de suero humano o un fragmento de la misma para incrementar la semivida de la molécula resultante. Tal

planteamiento está descrito, por ejemplo, en Ballance y col. documento EP0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención con las proteínas capaces de unión a proteínas de suero, tal como albúmina de suero humano para incrementar la semivida de la molécula resultante. Tal planteamiento está descrito, por ejemplo, en Nygren y col., documento EP 0 486 525.

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 métodos de producción y detección de tales inmunconjugados detectablemente marcados son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se describen más adelante a más detalle.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el fin 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 fluorescentemente marcado se determina exponiendo el inmunconjugado a luz de la apropiada longitud de onda y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos de marcación fluorescente incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Alternativamente, los inmunconjugados anti-Axl se pueden marcar detectablemente acoplado un anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunconjugado con marcador quimioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el trascurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcación quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

Igualmente, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar los inmunconjugados anti-Axl de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa 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 marcar incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

Alternativamente, se pueden marcar de manera detectable los inmunconjugados anti-Axl uniendo un anticuerpo monoclonal anti-Axl a una enzima. Cuando el conjugado anti-Axl-enzima se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Ejemplos de enzimas que se pueden usar para marcar de manera detectable inmunconjugados poliespecíficos incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de los restos marcadores a anticuerpos monoclonales anti-Axl se puede conseguir usando técnicas estándar conocidas en la técnica. La metodología típica a este respecto está descrita por Kennedy y col., *Clin. Chim. Acta* 70:1, 1976; Schurs y col., *Clin. Chim. Acta* 81:1, 1977; Shih y col., *Int'l J. Cancer* 46:1.101, 1990; Stein y col., *Cancer Res.* 50:1.330, 1990; y Coligan, *supra*.

Además, la conveniencia y la versatilidad de la detección inmunoquímica se puede aumentar usando anticuerpos monoclonales anti-Axl que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina (véase, por ejemplo, Wilchek y col. (eds.), "Avidin-Biotin Technology," *Methods In Enzymology* (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer y col., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992).)

Los métodos para la realización de inmunoensayos están bien establecidos (véase, por ejemplo, Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208 (Ritter and 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 and Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).)

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo monoclonal anti-Axl-fármaco. Un "conjugado anticuerpo monoclonal anti-Axl-fármaco" como se describe en el presente documento se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-Axl según la invención conjugado con un agente terapéutico. Tales conjugados anticuerpo monoclonal anti-Axl-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre las células que expresan Axl cuando se administran a un sujeto, tal como, por ejemplo, un sujeto con un cáncer que expresa Axl, generalmente 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 modo que el conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula que expresa Axl (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa Axl) cuando es absorbida o internalizada por la célula. Restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos son agentes quimioterapéuticos, enzimas convertidoras de profármaco, isótopos radioactivos o compuestos, o toxinas. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo monoclonal anti-Axl con un agente citotóxico 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 de difteria).

Clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, conectores de surco menor de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, agentes de alquilación (por ejemplo, complejos de platino tales como *cis*-platino, *mono*(platino), *bis*(platino) y complejos de platino trinuclear y carboplatino), antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluorinadas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de vinca, o similares.

Agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramizina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, captotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065 (Li y col., *Cancer Res.* 42:999-1.004, 1982), clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, fosfato de etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramizina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptozotocina, 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), conectores de surco menor de ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de vinca, CC-1065, SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptotecina), topotecán, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.

En ciertas realizaciones, un agente citotóxico es un compuesto quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, agentes potentes tales como análogos de CC-1065, calicheamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina, y palitoxina pueden estar ligados a un anticuerpo anti-expresante de Axl.

En variaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocido en la técnica como dolastatina-10) o un derivado del mismo. Generalmente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ácido cetó. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido bazoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina-p-fenilenediamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina), y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y la estructura de auristatina E y sus derivados se describen en la publicación de la solicitud de patente americana N.º 20030083263; las publicaciones de patente internacional N.º WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y las patentes americanas 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 de surco menor de ADN (véase, por ejemplo la patente americana N.º 6.130.237). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de unión de surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión de surco menor es una enediina (por ejemplo, calicheamicina).

En ciertas realizaciones, un conjugado anticuerpo-fármaco comprende un agente antitubulina. Ejemplos de agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de 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 bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, 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 y col., *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 mofetil), un inhibidor de dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, dideoxiuridina, iododeoxiuridina, poscarnet, o trifluridina.

En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl se conjuga con una enzima convertidora de profármaco. La enzima convertidora de profármaco se puede fusionar de manera recombinante con el anticuerpo o conjugar químicamente con el mismo usando métodos conocidos. Enzimas convertidoras de profármaco ilustrativas son carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitroreductasa y carboxipeptidasa A.

Las técnicas para conjugar los agentes terapéuticos con las proteínas, y en particular con los anticuerpos, son bien conocidas (véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld y col. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (Robinson y col. eds., Marcel Deiker, Inc., 2^o ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera y col. 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 y col. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe y col., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase también, la publicación 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 hacer un seguimiento de una enfermedad cancerosa y otras enfermedades en las que los niveles de Axl están modificados (incremento o disminución).

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 radiactiva u otros marcadores cualesquiera conocidos en la técnica descritos anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede marcar con una molécula radioactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero no se limitan a, átomo radioactivo para los estudios escintigráficos tales como ¹¹²³, ¹¹²⁴, ¹¹¹In, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re. Los anticuerpos de la invención también se pueden marcar con un marcador de espín para la formación de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imagen por resonancia magnética, irm), tal como yodo-¹²³, yodo-¹³¹, indio-¹¹¹, fluor-¹⁹, carbono-¹³, nitrógeno-¹⁵, oxígeno-¹⁷, gadolinio, manganeso o hierro. Después de la administración del anticuerpo, se puede detectar la distribución del anticuerpo dentro del paciente. Los métodos para detectar la distribución de cualquier marcador específico son conocidos por los expertos en la técnica y se puede usar cualquier método apropiado. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, tomografía computarizada (TC), tomografía por emisión de positrones (TEP), formación de imagen por resonancia magnética (IRM), fluorescencia, quimioluminiscencia y sonografía.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para diagnosticar y determinar la fase de las enfermedades cancerosas asociadas con la sobreexpresión de Axl (por ejemplo, en radioimagen). Las enfermedades cancerosas asociadas con la sobreexpresión de Axl generalmente incluyen pero no se limitan a cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gástrico, cáncer pancreático, tumores de célula glial tales como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de la glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, sarcomas, cánceres hematológicos (leucemias), astrocitomas, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello u otras enfermedades hiperproliferativas que expresan o sobreexpresan Axl.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para diagnosticar enfermedades distintas de los cánceres para las que se incrementa o disminuye la expresión de Axl (forma de Axl soluble o celular).

Generalmente, dichos métodos diagnósticos implican el uso de muestra biológica obtenida del paciente. Como se usa en el presente documento el término "muestra biológica" abarca una diversidad de tipos de muestra obtenidos de un sujeto y se pueden usar en un ensayo diagnóstico o de seguimiento. Las muestras biológicas incluyen pero no se limitan a muestras de sangre y otro líquido de origen biológico, muestras de tejido sólidas tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos, y la progenie de las mismas. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra de tejido recogida de un individuo sospechoso de tener una enfermedad cancerosa asociada con la sobreexpresión de Axl, y en una realización preferida de glioma, gástrico, de pulmón, pancreático, de mama, próstata, renal, hepático y endometrial. Por lo tanto, las muestras biológicas abarcan muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido.

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

- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto probable de padecer una enfermedad cancerosa asociada con la sobreexpresión de Axl con un anticuerpo según la invención en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con las células de la muestra biológica que expresan Axl;
- (b) detectar y/o cuantificar dichos complejos, de ese modo la detección de dichos complejos es indicativa de una enfermedad cancerosa asociada con la sobreexpresión de Axl.

10 Para hacer un seguimiento de la enfermedad cancerosa, el método de diagnóstico según la invención se puede repetir a diferentes intervalos de tiempo, para determinar si la unión del anticuerpo a las muestras se incrementa o disminuye, de ese modo se determina si la enfermedad cancerosa progresa o retrocede.

15 En una realización particular, la invención es un método de diagnóstico de una enfermedad asociada con la expresión o la sobreexpresión de Axl o la disminución o incremento de la forma soluble de Axl, tal como trastornos inmunes humanos, enfermedades tromboticas (trombosis y aterotrombosis), y también se pueden diagnosticar por el anticuerpo anti-Axl de la invención enfermedades cardiovasculares.

20 **Usos terapéuticos:**

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

25 1) El anticuerpo anti-Axl de la descripción se puede usar como tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas con la expresión, sobreexpresión o activación de Axl y Gas6. No hay limitaciones particulares sobre los tejidos tumorales, y los ejemplos incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gástrico, cáncer pancreático, tumores de célula glial tales como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de la glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, sarcomas, cánceres hematológicos (leucemias), astrocitomas, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Cánceres más preferibles son glioma, gástrico, de pulmón, pancreático, de

30 mama, próstata, renal, hepático y endometrial.

2) El anticuerpo anti-Axl de la descripción son activadores potenciales de la respuesta inmune innata y se pueden usar en el tratamiento de enfermedades inmunes humanas, tales como sepsis, se pueden usar como adyuvantes para la inmunización tal como para vacuna y se pueden usar como agentes antiinfecciosos (frente a bacterias, virus, parásitos).

35 3) El anticuerpo anti-Axl de la invención puede proteger o tratar enfermedades tromboticas tales como trombosis venosa y arterial y aterotrombosis.

4) El anticuerpo anti-Axl de la descripción puede proteger, prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares.

40 5) El anticuerpo anti-Axl de la descripción puede prevenir o inhibir la entrada de virus tales como los virus de Lassa y del Ébola y se pueden usar para tratar infecciones víricas.

45 En cada una de las realizaciones de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el anticuerpo monoclonal anti-Axl o el conjugado anticuerpo monoclonal anti-Axl-fármaco se libera de una manera coherente con las metodologías convencionales asociadas con el manejo de la enfermedad o trastorno para el que se busca tratamiento. Según con la descripción en el presente documento, se administra una cantidad eficaz del anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco a un sujeto en necesidad de tal tratamiento durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno.

50 Por tanto, un objetivo de la descripción se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con la expresión de Axl que comprende administrar un sujeto en necesidad del mismo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento o inmunoconjugado de la invención.

55 En el contexto de la invención, el término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, quiere decir revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección a la que tal término se aplica, uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

60 Según la invención, el término “paciente” o “paciente en necesidad del mismo” está destinado a un humano afectado o probable que esté afectado con enfermedad asociada con la sobreexpresión de Axl.

65 Por una “cantidad terapéuticamente eficaz” del anticuerpo de la invención se quiere decir una cantidad suficiente del anticuerpo para tratar dicho cáncer, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los anticuerpos y las composiciones de la presente

invención será decidido por el médico que le atiende dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del anticuerpo específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del anticuerpo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneos con el anticuerpo específico empleado; y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la técnica el comenzar la dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta que se alcance el efecto deseado.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado anticuerpo-fármaco se usa en combinación con un segundo agente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Cuando se usa para tratar cáncer, se puede usar un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención en combinación con terapias de cáncer convencional tales como, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia del cáncer de combinación con un anticuerpo anti-Axl o conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención incluyen agentes antiangiogénicos. En algunos aspectos, un anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención se administra conjuntamente con una citoquina (por ejemplo, una citoquina que estimula una respuesta inmune frente a un tumor).

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado anticuerpo-fármaco 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 anticuerpo-fármaco como se describe en el presente documento se usa en combinación con otro anticuerpo monoclonal terapéutico (mAb). Trastuzumab (Herceptin, Roche), Bevacizumab (Avastin, Roche) y Cetuximab (Erbix, Merck) son tres de tales mAb que se han aprobado. Otro mAb incluye, pero no se limita a: 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 anticuerpo-fármaco se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-Axl o conjugado anticuerpo-fármaco se puede formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de ese modo la molécula terapéutica se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica (Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19^a ed. 1995)). Las formulaciones además pueden incluir uno o más excipientes, conservantes, solubilizadores, agentes tampón, albumina para prevenir la pérdida de proteína sobre las superficies víricas, etc.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosis y el régimen naturalmente depende de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso, y sexo 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 similares.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, sodio, potasio, cloruro de calcio o magnesio y similares o mezclas de tales 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 usada para la administración se puede adaptar en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada de tratamiento.

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

Las formas farmacéuticas adecuadas para el 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 improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que existe la capacidad de ser inyectada fácilmente por jeringuilla. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe estar protegida frente a la acción

contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.

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

Un anticuerpo de la invención se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las cuales se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos sódicos, potásicos, amónicos, cálcicos o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, 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 se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede provocar por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar por el uso en las composiciones de los agentes que retrasan 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 ingredientes anteriormente enumerados, como sea requerido, seguido de esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de la preparación son técnicas de secado en vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

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

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la forma farmacéutica y en tal cantidad que es terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables anteriormente descrito, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debería tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se volvería isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Con respecto a esto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de solución de NaCl isotónica y o bien añadir a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectar en el sitio propuesto de la infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1.035-1.038 y 1.570-1.580). Alguna variación en la dosis ocurrirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el individuo.

Los anticuerpos de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. También se puede administrar dosis múltiple.

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 la administración oral; las cápsulas de liberación prolongada; y otra forma actualmente usada.

En ciertas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos dentro de las células hospedadoras. La formación y el uso de los liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.

Las nanocápsulas en general pueden atrapar compuestos en una forma estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (tamaño alrededor de 0,1 μm) en general se diseñan usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requerimientos para su uso en la presente invención, y tales partículas se pueden producir fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que están dispersos en un medio acuoso y espontáneamente forman vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). MLV en general tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, conteniendo una solución acuosa en el centro. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

15 **Kits:**

Finalmente, la invención también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención encuentran uso en la detección de la expresión de Axl (incremento o disminución), o en los ensayos terapéuticos o diagnósticos. Los kits de la invención pueden contener un anticuerpo acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo de tejido o perlas (por ejemplo perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de Axl *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Se puede proporcionar tal anticuerpo útil para la detección con un marcador tal como uno fluorescente o un radiomarcador.

25 La invención además se ilustrará mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberían interpretar de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

Leyendas de la figura

30 **Figura 1: Experimentos ELISA para investigar la afinidad y la especificidad de los anticuerpos monoclonales de ratón frente a hAxl.** Se incubaron placas recubiertas con Axl-Fc humana (h-Axl), Axl-Fc de ratón (m-Axl) o Mer-Fc (h-Mer) humana, Tyro-3-Fc (h-Tyro-3) con anticuerpos anti-Axl monoclonales (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 o 20G7-D9). Después del lavado, se añadió anti-IgG de ratón conjugado con HRP. 20G7-D9 no tiene reacción cruzada con h-Tyro-3 o h-Mer o m-Axl.

35 **Figura 2: Análisis de citometría de flujo de Axl de superficie celular en A549.** Se tiñeron A549 con anticuerpos anti-Axl monoclonales (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 o 20G7-D9) y anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. La tinción con 20G7-D9 da como resultado un desplazamiento por un orden de magnitud y demuestra la sobreexpresión de Axl sobre la superficie de estas células.

40 **Figura 3: Medición de la afinidad de 20G7-D9 en presencia o no de Gas6 usando BIAcore.** (A) sin Gas6, las tasas de asociación (k_a) y las tasas de disociación (k_d) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se derivó como la relación k_d/k_a . 20G7-D9 se une a Axl humana con alta afinidad, con una K_D de aproximadamente 53 nM. (B) 20G7-D9 no bloquea la unión de ligando Gas6 a Axl.

45 **Figura 4: Experimentos ELISA para investigar los efectos del mAb 20G7-D9 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 de ratón anti-Axl y se trataron con ligando Gas6. Los lisados celulares se transfirieron a placas de ELISA tipo sándwich PathScan® Phospho-Axl (PanTyr) (RD Systems, Minneapolis, MN). En comparación con otros anticuerpos. 20G7-D9 era capaz de bloquear o reducir significativamente la activación de Axl mediada por Gas6 en las cuatro líneas celulares como se indica por los niveles disminuidos de fosforilación de Axl en células estimuladas por Gas6.

50 **Figura 5: Ensayo de cicatrización/arañazo de herida para investigar los efectos de los anticuerpos de ratón anti-Axl sobre la migración y proliferación celular.** Después de cultivarse hasta confluencia, las células A549 se privaron de comida y se hirieron con una punta de pipeta. El Anti-Axl de ratón 20G7-D9 redujo la repoblación del área aclarada más significativamente que el mAb1, aunque las células se trataran con Gas6.

55 **Figura 6: Ensayo de viabilidad celular para investigar la eficacia antiproliferativa de anti-Axl 20G7-D9.** Se cultivaron células de cáncer pancreático Capan-1, PANC1 y MIAPaCa-2 en medio y se trataron en las concentraciones indicadas de mAb1 o 20G7-D9 durante 5 días. Se midió la viabilidad celular por MTS. 20G7-D9 inhibe más el crecimiento de todas las líneas celulares ensayadas que el mAb1 y el porcentaje de inhibición es dependiente de la concentración.

60 **Figura 7: El anticuerpo monoclonal anti-Axl 20G7-D9 induce una rápida regulación a la baja del receptor**

de Axl e inhibe la ruta de Akt. Se incubaron células en panel con 100 µg/ml de mAb 20G7-D9 para diferente tiempo. Las células se sometieron a lisis y se usó la proteína total para detectar por transferencia western. Como se muestra en la Figura 7A, mAb 20G7-D9 regula rápidamente a la baja la expresión del receptor de Axl en células Panc1. Después de una hora de incubación con mAb 20G7-D9, las células se incubaron 30 minutos con Gas6 y se analizó la presencia de fosforilación del receptor de Axl sobre tirosina 702 (activación de Axl) y fosforilación de Akt sobre serina 473 (activación de Akt) por transferencia Western. Como se muestra en la Figura 7B, la incubación del mAb 20G7-D9 conduce a una disminución en la fosforilación inducida por Gas6 de las proteínas Axl y Akt.

Figura 8: Modelos de xenoinjerto para investigar los efectos de los anticuerpos de ratón anti-Axl sobre el cáncer de mama triple negativo humano y el cáncer pancreático humano en ratones desnudos (*nude*). Se implantaron MDA-MB-231 (células de cáncer de mama triple negativo) o MIAPaca-2, BXPC3 (células de cáncer pancreático) en el costado derecho de ratones desnudos atímicos. Los animales recibieron 300 µg/inyección de los anticuerpos de ratón anti-Axl. Durante el tratamiento, se hizo un seguimiento del crecimiento de los tumores una vez por semana con un calibrador. 20G7-D9 redujo más el crecimiento general de los tumores pancreáticos y triple negativos en ratones desnudos que mAb1 (A, B, C) e incrementa significativamente la supervivencia general en comparación con el vehículo o Gemcitabina en ratones xenoinjertados con BXPC3 pancreáticas (D). Sobre los tumores de xenoinjertos de MIAPaca-2 explantados que recibieron dos inyecciones, también se observa una expresión a la baja drástica del receptor de Axl por el mAb 20G7-D9 (E).

Figura 9: Secuencia del hAxl-hFc y localización/secuencia del epítipo del mAb anti-Axl 20G7-D9. El epítipo del anticuerpo anti-Axl 20G7-D9 se identificó por ensayos de proteólisis limitados usando o bien Tripsina o GluC proteasas y análisis de espectrometría de masas MALDI. La figura muestra la composición del antígeno (hAxl-hFc) usado en este experimento que se compone de los aminoácidos 33 a 440 del dominio extracelular de Axl fusionado con la parte Fc de la IgG1 humana y Etiqueta de histidina. Cada uno de los dominios tipo inmunoglobulina y los dominios de fibronectina 3 de la proteína Axl están indicados en la secuencia. mAb 20G7-D9 se une a los tres péptidos (epítipo conformacional) localizados en el dominio 2 tipo inmunoglobulina y en los dominios primero y segundo de fibronectina (las secuencias están enmarcadas en la secuencia de la proteína y están detalladas en la tabla).

Figura 10: Representación de un modelo del ectodominio de Axl humana y localización del epítipo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl 20G7-D9 y el dominio de unión de Gas6.

La Figura 10A muestra una representación tipo viñeta del modelo del dominio extracelular completo de Axl humana con todos los cuatro dominios marcados. En la Figura 10B, el fragmento de los aminoácidos 305 a 315 de Gas6 se añadió como una lámina β gris clara, ilustrando el dominio de unión de Gas6 dentro del dominio 1 tipo inmunoglobulina de Axl. Finalmente, la Figura 10C presenta el epítipo 20G7-D9 dentro del dominio 2 tipo inmunoglobulina y los dominios de fibronectina tipo III 1 y 2 como superficies grises. Confirma primero que las tres partes del epítipo están localizadas sobre la superficie exterior de cada dominio. Segundo, la Figura 10C ilustra también que el sitio de interacción de Gas6 y el epítipo se sitúan lejos uno de otro en el ectodominio de Axl humana.

Ejemplo

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

Los anticuerpos monoclonales frente a Axl se desarrollaron por inmunización secuencial de ratones Balb/c. Los ratones Balb/c se hiperinmunizaron con el dominio extracelular de Axl humana (hAx1ECD) fusionado con el dominio de Fc humana (proteína hAxl-hFc; R&D system). Los ratones Balb/c se inyectaron subcutáneamente con 10 µg de hAxl-hFc soluble los días 0, 14 y 28 en presencia de adyuvante, completo de Freund (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 previamente descrito (Salhi y col. *Biochem. J.* 2004). Las células se cultivaron en placas (10⁵ por pocillo) con medios HAT para la selección de hibridoma. Después de 12 días, los sobrenadantes se recogieron y cribaron para la especificidad de unión de Axl (hAxl-hFc o hFc sola) por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Ocho clones positivos, que mostraban la mayor inmunounión después de la segunda ronda de subclonación por dilución limitante, se ampliaron para la producción *in vitro* a gran escala de mAb. Los sobrenadantes acondicionados se purificaron por cromatografía de afinidad de proteína G.

Ejemplo 2: Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl no tienen reacción cruzada con Axl de ratón u otros miembros de la familia del receptor TAM humano

Ejemplo 2.1: Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl no tienen reacción cruzada con Axl de ratón u otros miembros de la familia del receptor TAM humano como se determina por ELISA

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

Para el ensayo de la reacción cruzada, se incubaron placas recubiertas con Axl-Fc (h-Axl) humana, Axl-Fc (m-Axl) de ratón o Mer-Fc (h-Mer) humana, Tyro-3-Fc (h-Tyro-3) durante 1 hora a 37 °C y se lavaron cuatro veces en PBST. Las placas se incubaron con mAb anti-Axl (2 horas a 37 °C) y se lavaron cuatro veces en PBST. Las placas se incubaron con anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Sigma) a una dilución de 1:2.000 en PBST, BSA al 1 % (1 hora a 37 °C). Finalmente, se añadió una solución de orto-fenilenediamina (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 450 nm.

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

Ejemplo 2.2: El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl se une específicamente a células que expresan Axl como se determina por FACS

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

Ejemplo 2.3: Medición de la afinidad del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl evaluada por BIAcore

Para la determinación de la afinidad de unión de los anticuerpos anti-Axl, se usó una medición por resonancia por plasmones superficiales con un instrumento BIAcore-3000 (BIAcore AB, Uppsala, Suiza). Los experimentos se realizaron en las instalaciones del programa de "Proteomic Imaging and Molecular Interactions" (M. Pugnère) localizadas en el laboratorio. Para medir la afinidad entre los anticuerpos anti-Axl y hAxl-hFc, se capturaron los anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl por chips biosensores CM5 recubiertos con hAxl-hFc (usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore AB)). Para la medición de las cinéticas, se inyectaron diversas concentraciones de mAb anti-Axl (de 2 a 133 nM) en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, tampón P20 tensioactivo al 0,005 % a 25 °C con un caudal de 50 µl/min. Las tasas de asociación (k_a) y las tasas de disociación (k_d) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (programa informático BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la relación k_d/k_a . Como se indicó (Figura 3A), 20G7-D9 mostró una K_D de $5,3 \times 10^{-8}$ M.

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

Para el estudio de competición, se inyectó una concentración saturante de Gas6 (625 nM) sobre los chips biosensores CM5 con hAxl-hFc (usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore AB)). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl (666 nM) se inyectó sin retirar el Gas6. El mismo experimento se realizó inyectando en primer lugar el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl (666 nM) y en segundo lugar Gas6 (625 nM). Los resultados mostraron que 20G7-D9 no compitió con el ligando Gas6 por hAxlECD (Figura 3B).

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

Se realizaron experimentos ELISA para investigar si el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl de la invención era capaz de bloquear la fosforilación de Axl inducida por ligando Gas6. En resumen, 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 medio de crecimiento normal en placas de 6 pocillos de fondo plano. Al día siguiente, el medio de crecimiento se reemplazó por medio libre de suero para privar de comida las células durante la noche durante 24 horas. Las células se preincubaron con 100 µg/l de anti-Axl monoclonal de ratón purificado de la invención y, a continuación, se trataron con o sin 250 ng/ml de Gas6 incubado con Gas6 durante 30 min a 37 °C. Después, el medio se separó, las células se sometieron a lisis 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 (v/v) al 0,1 %, glicerol al 10 % (v/v), fluoruro sódico 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, ortovanadato sódico 1 mM (Sigma)) complementado con inhibidores de fosfatasa y proteasa (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) durante 30 min. Los restos celulares se separaron por centrifugación y las concentraciones proteicas se determinaron por la reacción colorimétrica de Bradford. El kit de ELISA tipo sándwich PathScan® Phospho-Axl (PanTyr) (RD Systems, Minneapolis, MN) se usó como se describe por el fabricante para la detección del nivel de fosfo-Axl midiendo la absorbancia a 450 nm en un ensayo colorimétrico.

Como se muestra en la Figura 4, mAb 20G7-D9 inhibió fuertemente la fosforilación de Axl inducida por ligando Gas6 en todas las líneas celulares de cáncer pancreático. Otros mAbs no inhibieron o ligeramente la fosforilación de Axl

inducida por ligando Gas6 en todas las líneas celulares de cáncer pancreático.

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

5 Se realizó un ensayo de cicatrización de herida observando el proceso de cicatrización en la que las células de los bordes de la herida artificial migran hacia el área de la herida. Las células A549 se cultivaron hasta confluencia o cerca de confluencia (>90 %) en placas de 24 pocillos. 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 invadir y cerrar el campo de la herida. Las células se aclararon muy suavemente con PBS y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl purificados de la invención (100 µg/ml) con o sin 100 µg/ml de Gas6. La tasa de migración celular se determinó 24 horas después del tratamiento usando formación de imagen microscópica. Como se muestra en la Figura 5, mAb 20G7-D9 inhibió fuertemente la migración celular ya que el área de curación era todavía visible al contrario que las células tratadas con mAb1 o Gas6.

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

Se sembraron células de cáncer pancreático MIAPaca-2, Capan-1 y PANC1 a 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl (25, 50 o 100 µg/ml) durante 5 días. Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo usando el ensayo MST (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). MST es reducido por las células en un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo de tejido. La absorbancia del formazán a 490 nm se midió usando un espectrofotómetro. Como se muestra en la Figura 6, mAb 20G7-D9 inhibió fuertemente la proliferación de las células pancreáticas mientras que se observó una ligera inhibición con el otro anticuerpo específico a Axl (mAb1).

25 Ejemplo 7: El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl humana de la invención regula a la baja 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 mAb 20G7-D9, se analizó su efecto directo sobre el receptor de Axl y las rutas de señalización corriente abajo (se ha publicado que la activación del receptor de Axl por ligando Gas6 induce varias cascadas de señalización claves particularmente la ruta de Akt). Se analizaron la regulación a la baja del receptor de Axl y la fosforilación del receptor de Axl y Akt en una línea celular de cáncer pancreático (células Panc-1) tratadas con 20G7-D9 mAb por transferencia western.

35 Se colocaron células Panc-1, línea celular de cáncer pancreático, en placa de 6 pocillos (1x10⁶ células por pocillo) y se incubaron con 100 µg/ml de 20G7-D9 a 37 °C. Las líneas celulares recogidas a diferentes momentos se sometieron a lisis con tampón (NaCl 150 mM, TRIS 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, TRITONX100 al 1 %) que contenía fluoruro de finilmetilsulfonilo 2 mM, fluoruro sódico 100 mM, ortovanadato sódico 10 mM, y un comprimido de mezcla de inhibidor de proteasa completa (Sigma St Louis, MO). Después de una resolución sobre SDS-PAGE al 8 % o 10 % bajo condiciones reductoras, las proteínas se transfirieron sobre membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA) que, a continuación, se saturaron en PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % y leche en polvo desnatada al 5 %. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con diluciones apropiadas de anti-Axl humana (R&D systems), anti-fosfo (Y702) Axl o anti-fosfo (S473) Akt de Cell Signaling Technology. Las inmunotransferencias se normalizaron usando un anticuerpo dirigido a GAPDH (Millipore). A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante apropiados (Bio-Rad) y se procesaron para la detección ECL (Amersham) y el análisis con G:BOX iChemi (Syngene).

50 Cuando las células se trataron con mAb 20G7-D9, la expresión de Axl disminuyó rápidamente después de 90 minutos y es casi indetectable después de 24 horas (Figura 7A). Una inducción de la cantidad de fosfo-Axl y fosfo-Akt se observó cuando las células se estimularon con Gas6. Ambas señales se inhibieron drásticamente por pretratamiento con mAb 20G7-D9 (Figura 7B).

55 Ejemplo 8: El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl humana de la invención reduce el crecimiento *in vivo* del cáncer de mama triple negativo y el cáncer pancreático humanos asociados con la regulación a la baja del receptor de Axl

Todos los experimentos *in vivo* se realizaron en conformidad con las directrices francesas para los estudios con animal experimental (Acuerdo n.º C34-172-27). Se compraron ratones desnudos atímicos hembras de seis semanas de vida de Harlan. Se implantaron células de cáncer de mama triple negativo (5x10⁶; MDA-MB-231; número ATCC: HTB-26) o células de carcinoma pancreático (3,5x10⁶, BXPC3; 5x10⁶, MIAPaCa-2) en el costado derecho de los ratones desnudos atímicos. Los ratones que portaban tumor se distribuyeron al azar en diferentes grupos de tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm³. Los ratones se trataron por inyecciones intraperitoneales con vehículo (NaCl al 0,9 %) o anticuerpos monoclonales de ratón anti-Axl de la invención solos a 300 µg/inyección (dos veces a la semana durante 4 semanas consecutivas) o con gemcitabina (GEMZAR). El volumen del tumor se midió semanalmente con un calibrador. Los resultados para BXPC3 también se expresaron por una curva de supervivencia de Kaplan-Meier modificada, usando el tiempo tomado por el tumor para

alcanzar un volumen predefinido de 2.000 mm³. Un retraso medio se definió como el tiempo al que el 50 % de los ratones tenían un tumor que alcanzaba el volumen de 2.000 mm³. El mAb anti-hAxl 20G7-D9, pero no mAb1, disminuyó el crecimiento del tumor de MDA-MB-231 y los xenoinjertos pancreáticos (Figura 8A, B, C). La curva de Kaplan-Meier modificada demostró un retraso de 15 días para alcanzar el 50 % de supervivencia cuando los ratones se trataron con anticuerpo 20G7-D9, cuando se compara con ratones tratados con NaCl (Figura 8D).

Otra serie de experimento, los xenoinjertos MIApaca-2 tratados con mAb 20G7-D9 o mAb de isotipo de IgG1 murino irrelevante (Px) se explantaron después de dos inyecciones de tratamiento con mAb, y se usaron para la detección por transferencia Western de los receptores de Axl (mAb anti-Axl, R&D systems) o proteína control de GAPDH (anti-GAPDH, Millipore). El tratamiento con mAb 20G7-D9 indujo una disminución marcada de la expresión de Axl en tumores (Figura 8E).

Ejemplo 9: El epítipo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl humana es un epítipo conformacional compuesto de 3 péptidos, uno localizado en el dominio 2 tipo inmunoglobulina, uno en el dominio 1 de fibronectina 3 y uno en el dominio 2 de fibronectina 3 de Axl humana.

Para definir las estructuras del epítipo, se realizaron ensayos de proteólisis limitada de un complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado. Para mapear el epítipo 20G7-D9, el hAxl-hFc se unió por afinidad al anticuerpo monoclonal 20G7-D9 inmovilizado bajo condiciones fisiológicas. A continuación, se realizaron una serie de escisiones enzimáticas proteolíticas (serina proteasa Tripsina y endoproteinasa GluC) para separar los restos de hAxl-hFc que estaban desprotegidos por el 20G7-D9. Después de la elución, los restos protegidos, es decir, el epítipo 20G7-D9, se identificaron basándose en sus pesos moleculares, determinados por el análisis de MALDI-MS de los péptidos que se unieron por afinidad al anticuerpo inmovilizado.

El anticuerpo monoclonal 20G7-D9 (250 µg) se acopló a microesferas magnéticas ProMag PMC3N (Bangs Laboratories) 1 hora a temperatura ambiente según los procedimientos del proveedor. Se incubaron 50 µg del complejo de microperlas 20G7-D9 con 50 µg del antígeno hAxl-hFc (R&D systems) y dejaron que se unieran durante 90 minutos a 4 °C. El antígeno libre se separó por tres lavados con tampón. El complejo inmune de 20G7-D9 y hAxl-hFc se digirió a 37 °C con 0,35 µg de Tripsina o GluC durante 2 h 15. El sobrenadante se separó por centrifugación (2.000 g, 4 °C, 3 min) y se descargó. Las microperlas asociadas con 20G7-D9 y restos protegidos de hAxl-hFc se lavaron tres veces con tampón. Se dejó que la disociación se desarrollara durante 40 min a temperatura ambiente usando TFA al 0,1 % (ácido trifluoroacético). Los espectros se obtuvieron por espectrometría de masas MALDI (ABSCIEX MALDI 4800 con un Láser Nd/YAG a 355 nm, 200 Hz, 20 kV para la fuente de tensión, el tiempo de extracción de 250 ns) con la suma de 1.500 descargas de láser. La matriz usada para la muestra era ácido α-ciano-4-hidroxycinnamínico (CHCA) a 5 mg/ml. La composición de secuencia del antígeno hAxl-hFc (R&D system) y la secuencia de epítipo del 20G7-D9 identificada se muestran en la Figura 9. El anticuerpo 20G7-D9 monoclonal de ratón se une a un epítipo conformacional 3D compuesto de 3 péptidos uno colocado en el dominio 2 tipo inmunoglobulina (secuencia: "TSSFSCAEAHNAK"), uno en el dominio 1 de fibronectina tipo III (secuencia: "GMGIQAGEPDPPEE") y uno colocado en el dominio 2 de fibronectina tipo III (secuencia: "TPEVLMDIGLRQE").

Ejemplo 10: El epítipo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Axl humana se expone al área de superficie disolvente accesible y está estructuralmente localizado lejos del sitio de interacción de Gas6

El modelo de dominio extracelular de la proteína Axl humana se construyó en 2 etapas. Primero, los dominios tipo inmunoglobulina (dominio 1 y 2) se extrajeron de la estructura cristalográfica disponible en el Banco de Datos Proteico bajo el código 2C5D. Esta estructura representa un complejo Axl/Gas6 en el que los dominios tipo inmunoglobulina del ectodominio de Axl se entrecruzan por el primer dominio tipo laminina G de Gas6. Desafortunadamente, los dos dominios de fibronectina tipo III (FN3) de Axl aún no se han cristalizado y, por lo tanto, necesitan ser modelizados. El modelo se construyó por modelado por homología usando la estructura 3D del tándem de FN3 A77-A78 de la cadena A de la proteína titina humana (PDB id: 3LPW) como molde. Después del alineamiento, las secuencias de las dos proteínas comparten una identidad de 22,8 %. Finalmente, los dominios tipo inmunoglobulina y los dominios de fibronectina tipo III se ligaron juntos entre leucina 224 y prolina 225 modificando los ángulos dihedrales para minimizar el estorbo estérico entre las dos cadenas laterales de los dos dominios.

A continuación, se identificaron el epítipo del anticuerpo de ratón anti-Axl 20G7-D9 así como los dominios de unión de Gas6 sobre este modelo del ectodominio completo de Axl humana. Este modelo demuestra la localización específica de los tres sitios antigénicos localizados en superficie reconocidos por 20G7-D9 sobre Axl (Figura 10). Este modelo demostró también que el epítipo 20G7-D9, compuesto de los 3 péptidos (el primero en el 2 tipo IgG, el segundo en el dominio 1 de FN3 y el tercero en el dominio 2 de FN3 de Axl), está localizado lejos del sitio de unión a ligando (sitio de unión a Gas6 que está localizado en el dominio 1 tipo IgG) de acuerdo con los estudios de competición realizados (ejemplo 3; Figura 3B).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM ORIBASE PHARMA

ES 2 712 736 T3

<120> Anticuerpos anti-Axl y sus usos

<130> BIO11241 ROBERT / MC

5 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> cadena VH

<400> 1

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

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

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

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Asn Asp Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Leu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

20 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> H-CDR1

30 <400> 2

Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5

ES 2 712 736 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Thr Pro Trp
 85 90 95

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

5 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> L-CDR1
 <400> 6

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10

15 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> L-CDR2
 <400> 7

Asn Ala Lys Thr Leu Ala
 1 5

25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> L-CDR3

ES 2 712 736 T3

<400> 8

Gln His His Tyr Ala Thr Pro Trp Thr
1 5

5 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> epítopo 1

<400> 9

Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys
1 5 10

15 <210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> epítopo 2

25 <400> 10

Gly Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu
1 5 10

30 <210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> epítopo 3

<400> 11

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

40 <210> 12
<211> 652
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> hAxl-hFc

50 <400> 12

ES 2 712 736 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

ES 2 712 736 T3

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
 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

ES 2 712 736 T3

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

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

ES 2 712 736 T3

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 a antígeno del mismo, 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, en donde dicho anticuerpo se une al dominio extracelular de Axl en la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:9, en la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:10 y en la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:11.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:1
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 en donde la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:5.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno según las reivindicaciones 2 y 3 en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:1 y la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO:5.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 4 que es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo de ratón/humano quimérico.
- 30 6. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 que es un anticuerpo humanizado.
- 35 7. Un fragmento de un anticuerpo monoclonal según 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 ácido nucleico que codifica una cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8 o un vector según la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como fármaco.
13. El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno según 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 a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el diagnóstico de enfermedades cancerosas asociadas con la sobreexpresión de Axl.

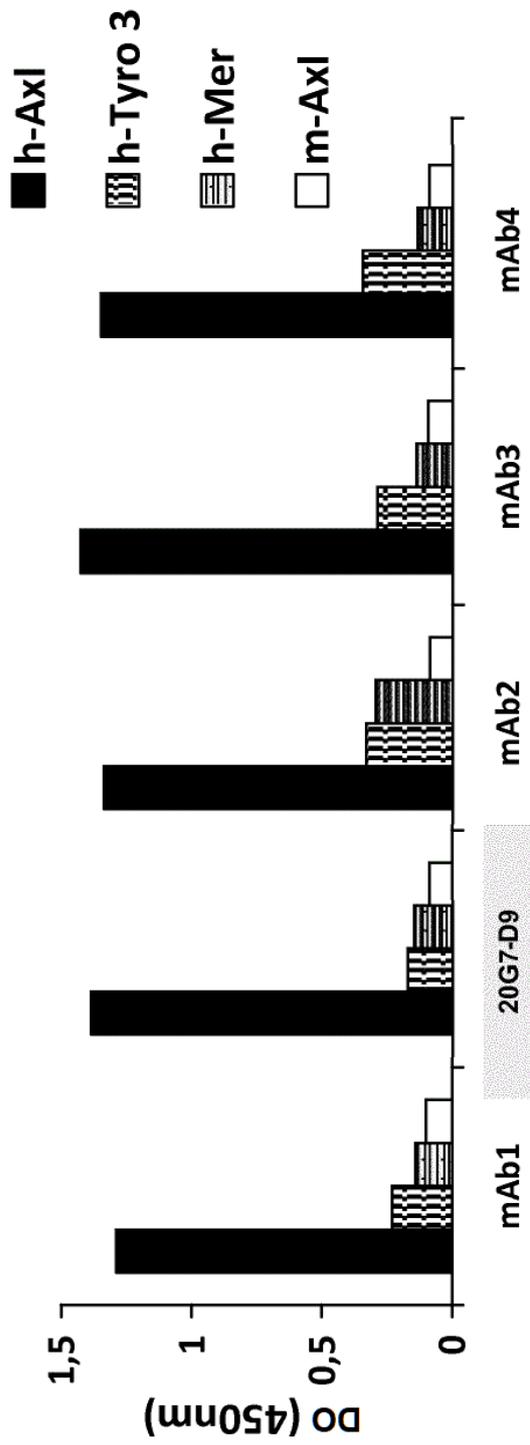


Figura 1 B

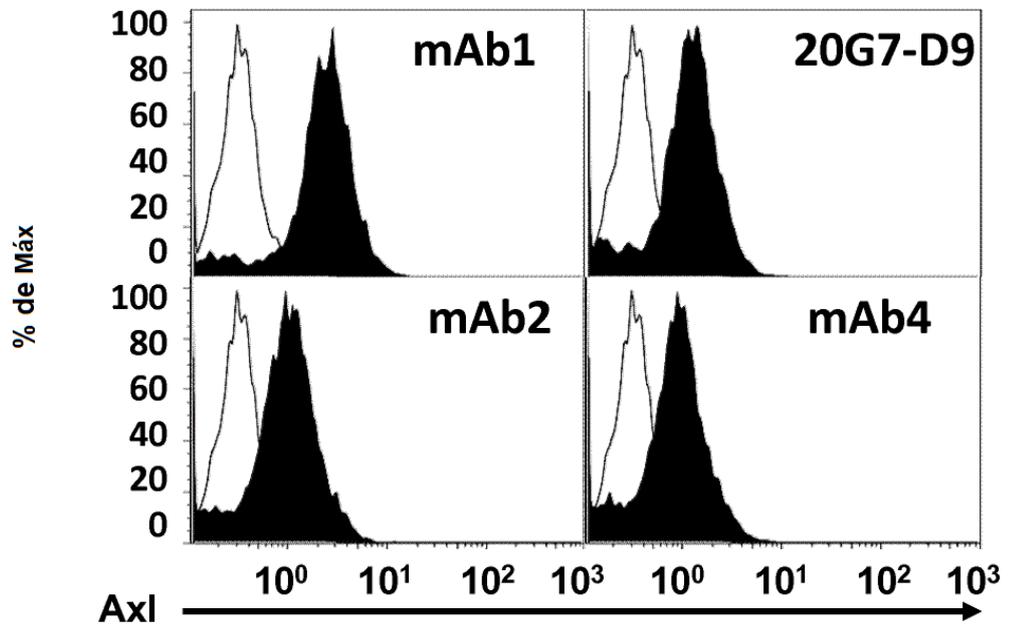


Figura 2

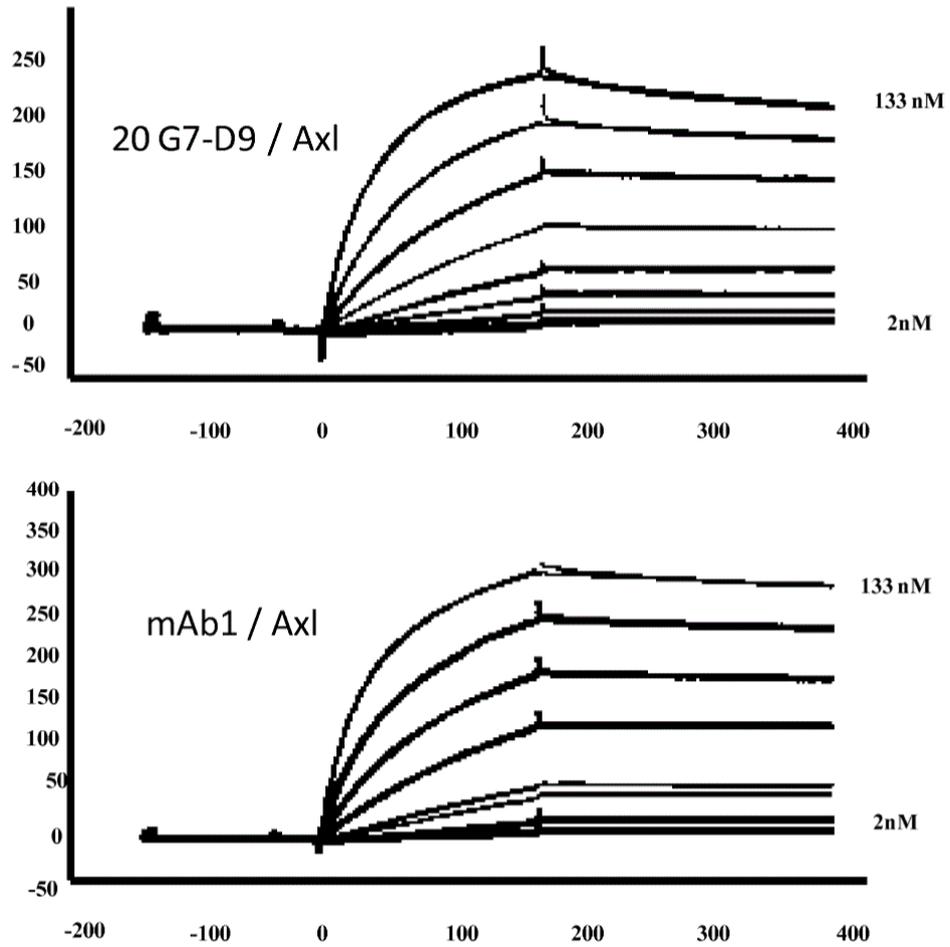


Figura 3A

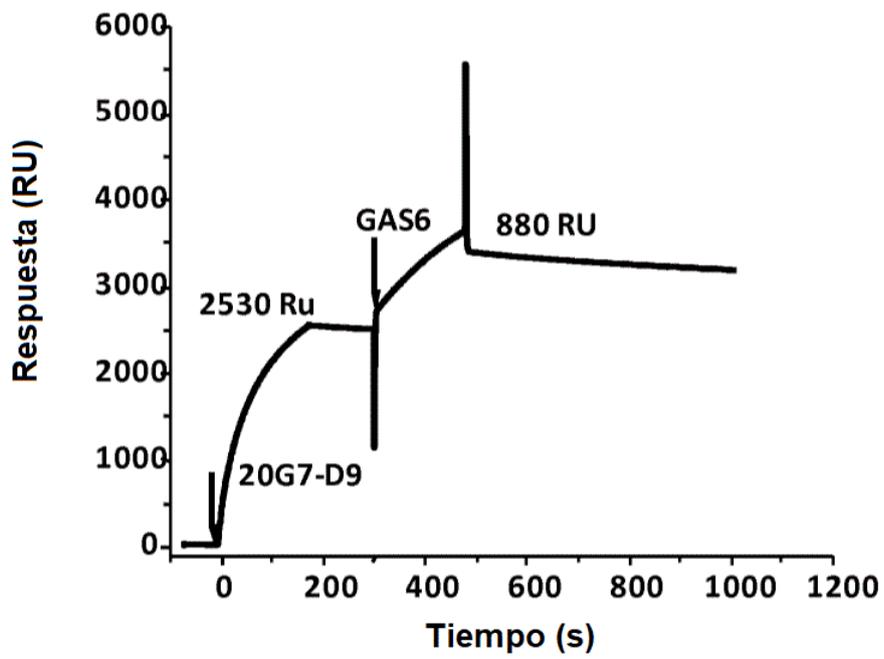
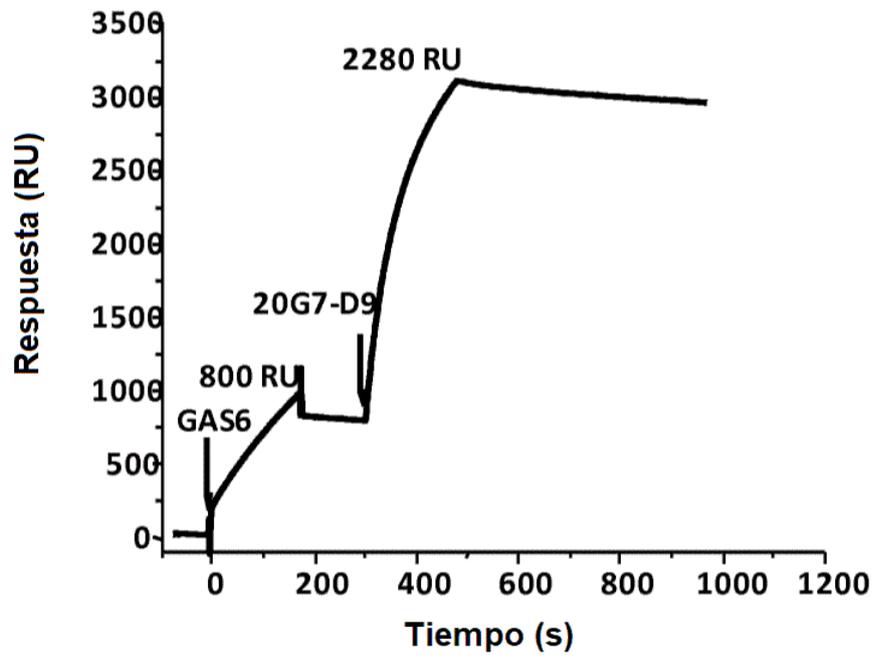


Figura 3B

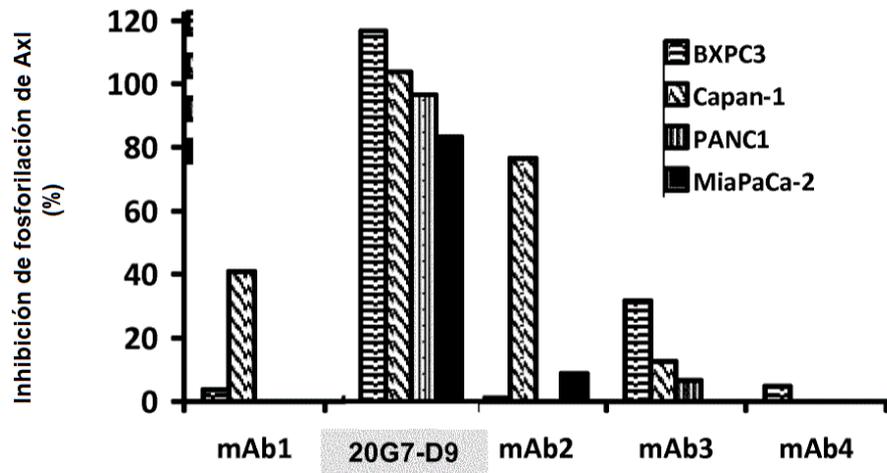


Figura 4

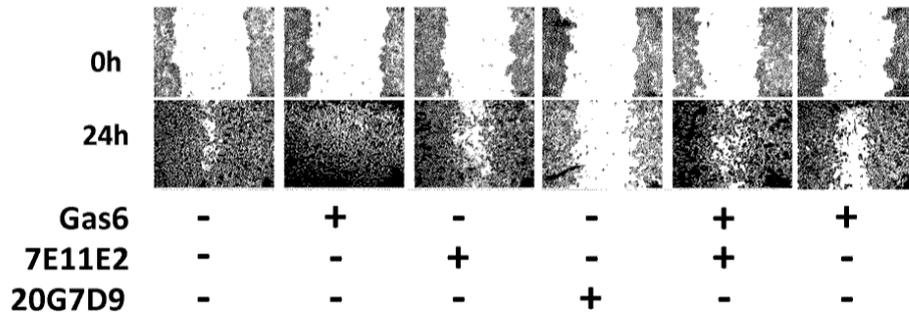


Figura 5

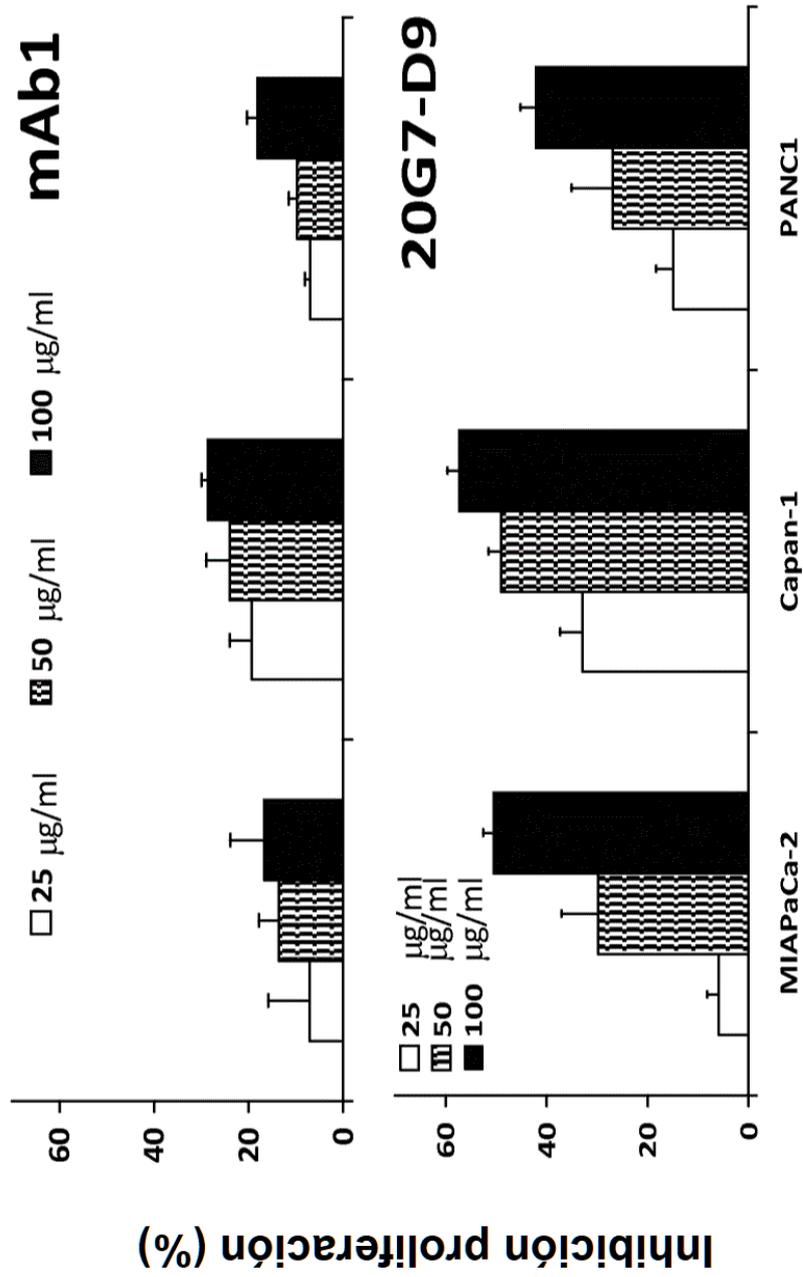


Figura 6

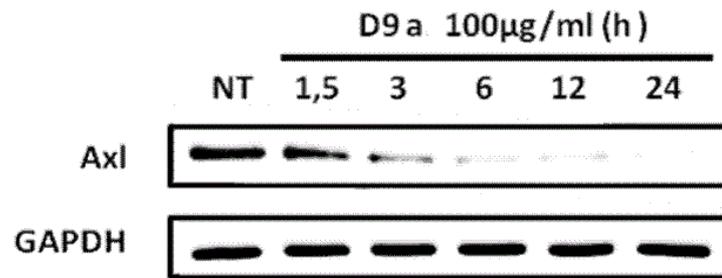


Figura 7A

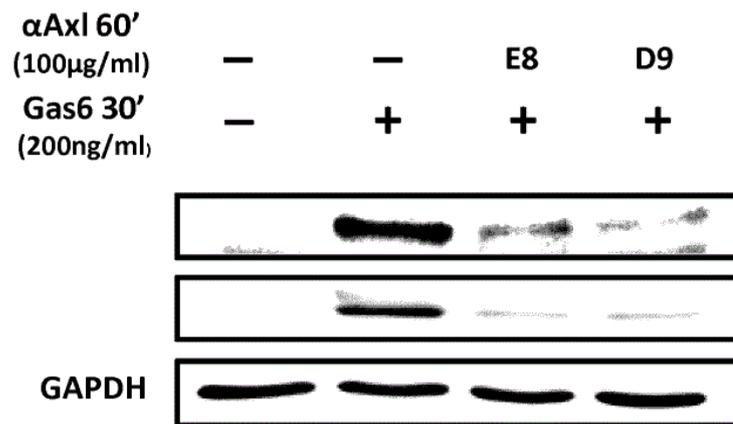


Figura 7B

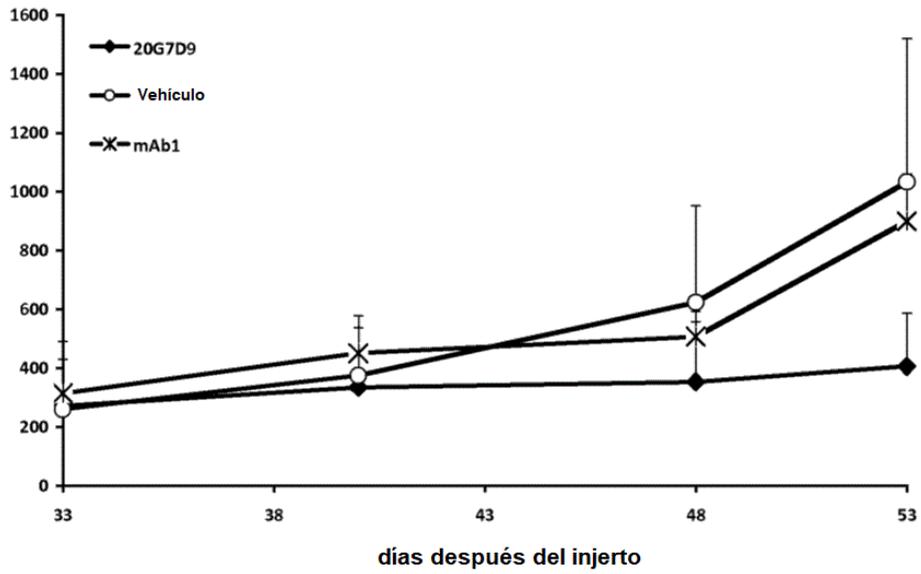


Figura 8A

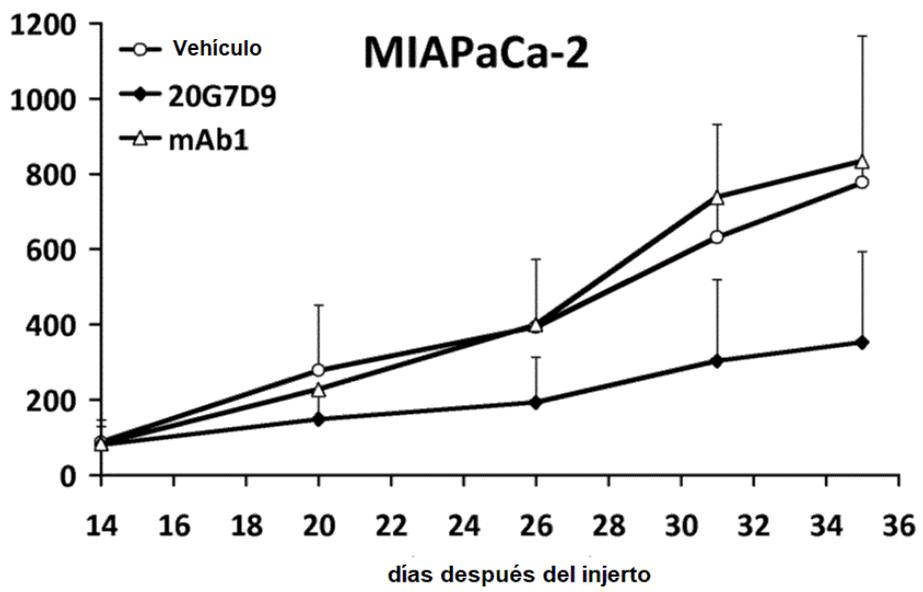


Figura 8B

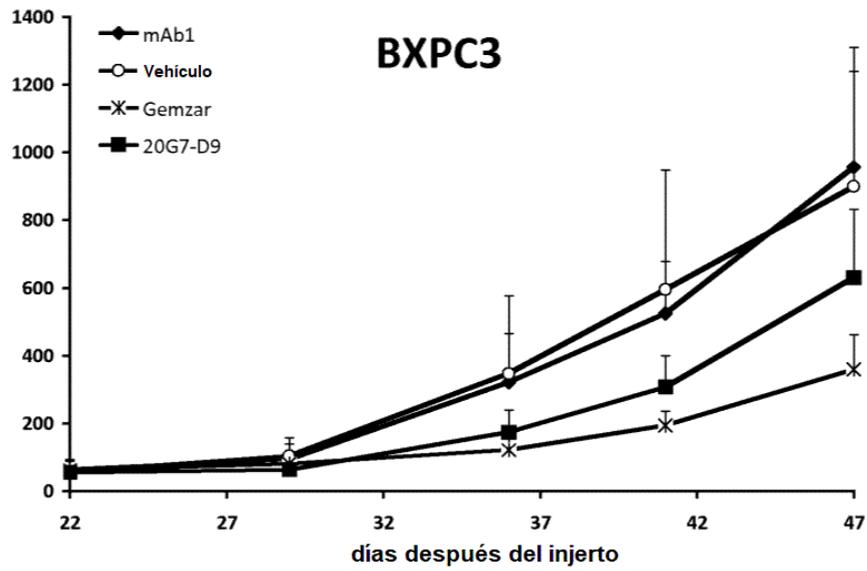


Figura 8C

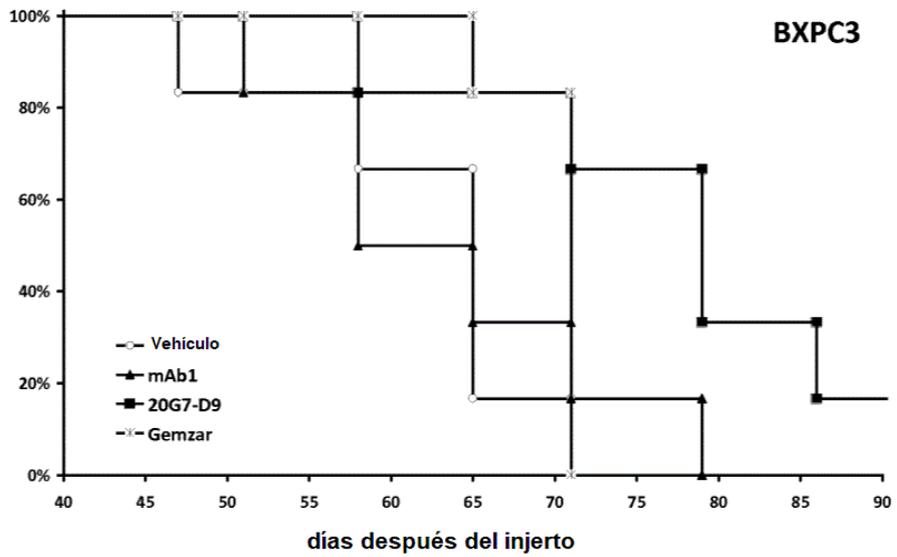


Figura 8D

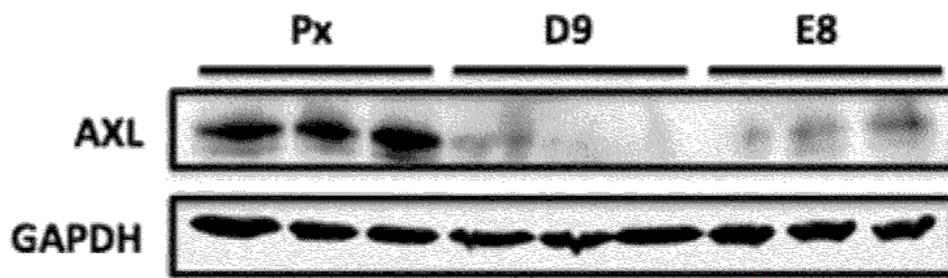


Figura 8E

Composición hAxI-hFc

Axl humana (GIJ33-Pro440)	DIEGRMD	IgG1 humana (Pro100-Lys330)	Etiqueta 6His
------------------------------	---------	--------------------------------	---------------

33
 ESEPPVGN FGNITGARGL TGIILRQQLQV QSEPPVHHL RDGQILELAD STQTVPLGE DEQDIIIVVS QLRITSLQLS
 dominio 1 tipo IgG

DTGQYQCLVF LQHQTFVSQF GYVGLBSLPI FLEPPEDRTV AANTPPNLSQ QAQGPPEPVD LMLQDAVPL ATAFGHGFOR
 dominio 2 tipo IgG

SLHVPGLNKT SPSFCEAHNA KGVTTSTRTAT ITVLPQQPFN LHLVSRQFTE LEVAMTPGLS GIVPLTHCTL QAVLSNDGNG
 dominio 1 FNIII

IQAGEPDPPE BELTSCASVP PHQLPLSLH PHTPYHIRVA CTSSQGFSSM THMLPVEIPE GVEPLGPEPNI SATRNGSQAF
 dominio 2 FNIII

VHMOEPPAPL QGTLIGYRLA YQGDIPEVL MDIGLRQEVV LELQGDGSSVS NLTVCVAAYT AAGDGFMSLP VPLEAMRPVK
 dominio 2 FNIII

440
 EPSTFARSPD DIEGRMDPKS CDKTHIQPPG PAPELLGSES VPLRPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVDSHE DEVKRNMIV
 DGVVHNNAKT KPREEQVNST YKVASVLTVL HQMFLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KQGFREPOVY TLPEFRDELV
 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAY EMESNGQFEN NYKTFPVLV SLDGPFLLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSYMH EALHNHYTQK
 SLSLSPGKHH HHHH

Epitopo 20G7-D9	TSSFSCSAHNAK (2 tipo IgG: 200-211)
	GMGIQAGEPDPPE (FNIII-1: 268-281)
	TFEVLMDIGLRQE (FNIII-2: 376-388)

Figura 9

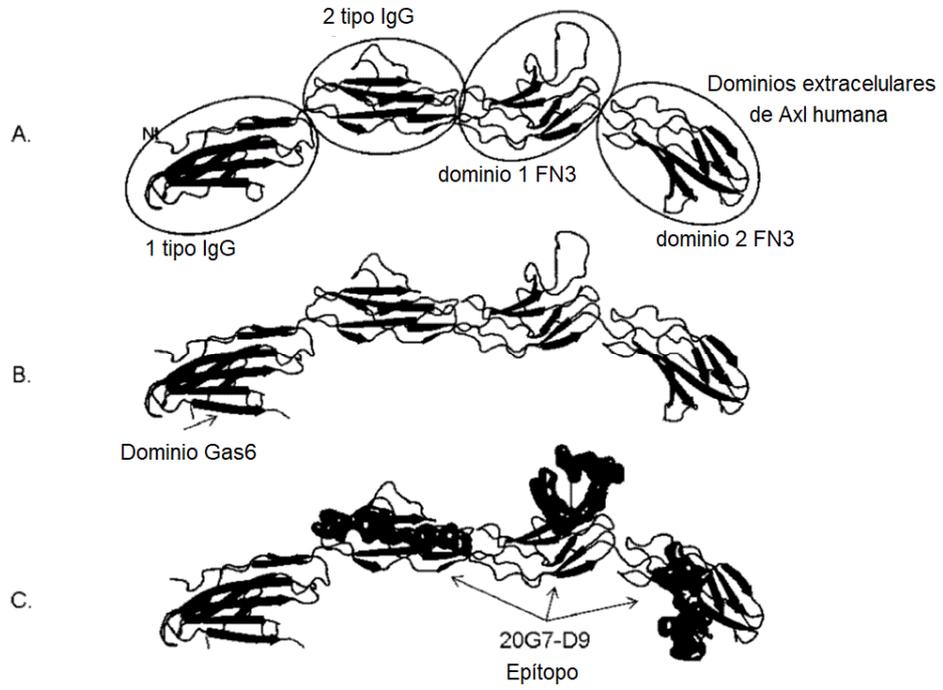


Figura 10