

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 950**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2016 PCT/EP2016/050677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2016 E 16700495 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3245229**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor de la orexina de tipo 1**

30 Prioridad:

16.01.2015 EP 15305038

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

21.02.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (25.0%);

INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE

MONTPELLIER (25.0%) y

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (25.0%)

72 Inventor/es:

COUVINEAU, ALAIN;

VOISIN, THIERRY;

NICOLE, PASCAL;

ROBERT, BRUNO;

MARTINEAU, PIERRE y

CHENTOUF, MYRIAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 950 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 monoclonales humanos contra el receptor de la orexina de tipo 1

Campo

5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor de la orexina de tipo 1 (OX1R) y a sus usos para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

10 Las orexinas (hipocretinas) comprenden dos neuropéptidos producidos en el hipotálamo: la orexina A (OX-A) (un péptido de 33 aminoácidos) y la orexina B (OX-B) (un péptido de 28 aminoácidos) (Sakurai T. et al., Cell, 1998, 92, 573-585). Se ha encontrado que las orexinas estimulan el consumo de alimentos en las ratas, lo que sugiere un papel fisiológico de esos péptidos como mediadores en el mecanismo central de retroalimentación que regula la conducta alimentaria. Las orexinas regulan los estados de sueño y vigilia, abriendo nuevos enfoques terapéuticos potenciales para pacientes narcolépticos o insomnes. También se ha indicado que las orexinas desempeñan un papel en la excitación, la recompensa, el aprendizaje y la memoria. Se han clonado dos receptores de orexina y se han caracterizados en mamíferos. Pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (receptor que incluye 7 dominios transmembranales) (Sakurai T. et al., Cell, 1998, 92, 573-585): el receptor de la orexina-1 (OX1R o HCTR1) es más selectivo para OX-A que para OX-B y el receptor de la orexina-2 (OX2R o HCTR2) se une tanto a OX-A como a OX-B. Un estudio reciente muestra que la activación de OX1R mediante orexina puede promover una fuerte apoptosis *in vitro* e *in vivo* en las células de cáncer de colon, incluso cuando son resistentes al fármaco utilizado más comúnmente en la quimioterapia contra el cáncer de colon (Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. Cancer Res. 1 de mayo 2011; 71(9):3341-51). En particular, se ha mostrado que OX1R promueve la apoptosis en las líneas celulares de cáncer a través de un mecanismo que no está relacionado con la activación de la fosfolipasa C mediada por Gq y oscilaciones momentáneas del calcio celular. Las orexinas inducen de hecho una fosforilación de tirosina de 2 motivos basados en tirosina en OX1R, ITIM e ITSM, lo que da lugar al reclutamiento de la fosfotirosina fosfatasa SHP-2, cuya activación es responsable de la apoptosis mitocondrial (Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. FASEB J. 2008 Jun; 22(6):1993-2002; El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dic; 23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Agosto 6). Sorprendentemente, todos los tumores colorrectales primarios independientemente de su localización y los estadios de Duke, expresaban OX1R, mientras que los colonocitos normales adyacentes, así como tejidos normales de control, eran negativos. Además, la expresión de OX1R se ha confirmado recientemente en cáncer de páncreas, hepatocarcinomas y cáncer de próstata avanzado. En consecuencia, la técnica anterior respalda que OX1R es un talón de Aquiles de los cánceres (incluso quimiorresistencia) y sugiere que OX1R es una diana relevante para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, los anticuerpos contra OX1R que son capaces de promover una apoptosis de las células cancerosas, nunca se han descrito en la técnica anterior.

40 Se ha descrito el uso de técnicas inmunohistoquímicas para investigar la expresión del receptor de la orexina-1 (OX1R) (Mihara et al., Journal of molecular neuroscience, 2010, vol. 43 nº 2, 162-168).

Compendio

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor de la orexina de tipo 1 (OX1R) y a sus usos para el tratamiento del cáncer.

45 En particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano contra OX1R que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de C2, ii) la H-CDR2 de C2 y iii) la H-CDR3 de C2 y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de C2, ii) la L-CDR2 de C2 y iii) la L-CDR3 de C2, en donde

- la H-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 31 hasta el residuo de aminoácido en la posición 35 en SEQ ID NO: 1,
- 50 - la H-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 50 hasta el residuo de aminoácido en la posición 66 en SEQ ID NO: 1,
- la H-CDR3 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 99 hasta el residuo de aminoácido en la posición 109 en SEQ ID NO: 1,
- la L-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 23 hasta el residuo de aminoácido en la posición 36 en la SEQ ID NO: 2,

- la L-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 52 hasta el residuo de aminoácido en la posición 58 en SEQ ID NO: 2, y
- la L-CDR3 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 91 hasta el residuo de aminoácido en la posición 100 en SEQ ID NO: 2.

5 En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanos contra OX1R. En particular, los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se caracterizan por una o más propiedades funcionales tales como que son anticuerpos humanos, se unen con alta afinidad al OX1R humano, pueden reaccionar de forma cruzada entre la forma murina y humana de OX1R, y son capaces de favorecer la apoptosis de células cancerosas y la inhibición *in vivo* del desarrollo tumoral. En particular, la presente descripción proporciona anticuerpos que se obtienen a partir del anticuerpo C2 como se describe en el EJEMPLO.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "OX1R" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un tipo de receptor de la orexina, también conocido como receptor de hipocretina de tipo 1, que es una proteína que en los humanos está codificada por el gen HCRTR1. De acuerdo con la presente descripción, OX1R favorece la apoptosis en las diversas líneas celulares del cáncer a través de un mecanismo que no está relacionado con la activación de la fosfolipasa C mediada por Gq y oscilaciones momentáneas del calcio celular. Las orexinas inducen de hecho la fosforilación de la tirosina de 2 motivos basados en tirosina en OX1R, ITIM e ITSM, lo que da lugar al reclutamiento de la fosfotirosina fosfatasa SHP-2, cuya activación es responsable de la apoptosis mitocondrial (Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. FASEB J. 2008 Jun; 22(6):1993-2002; El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dic; 23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Ago 6). Se cree que los anticuerpos humanos de la presente descripción son capaces de favorecer la apoptosis de células cancerosas a través del mismo mecanismo.

Tal y como se usa en esta memoria, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán igualmente en la presente descripción. El término "anticuerpo" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo incluye no solo moléculas de anticuerpos completos, sino también fragmentos de anticuerpos, así como variantes (incluidos los derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de la unión al antígeno. Los dominios de regiones constantes de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como asociación de cadenas de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria, unión del complemento y unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están formados por residuos que provienen principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDRs). Ocasionalmente, los residuos procedentes de regiones no hipervariables o estructurales (FR) pueden participar en el sitio de unión del anticuerpo o influir en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Regiones determinantes de complementariedad o CDRs se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de la unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión natural de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDRs, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, normalmente incluye seis CDRs, que comprenden el conjunto de CDRs de cada una de las regiones V de la cadena pesada y la cadena ligera. Las regiones estructurales (FRs) se refieren a secuencias de aminoácidos intercaladas entre las CDRs. Los residuos en dominios variables de anticuerpos están numerados convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se establece en Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (de aquí en adelante "Kabat et al."). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva. Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos en las secuencias SEQ ID. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más que en la numeración estricta de Kabat, correspondiente a un acortamiento o una inserción en un componente estructural, ya

5 sea de la región estructural o la región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica de dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante una alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada se encuentran en los residuos 31-35B (H-CDR1), los residuos 50-65 (H-CDR2) y los residuos 95-102 (H-CDR3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera se encuentran en los residuos 24-34 (L-CDR1), los residuos 50-56 (L-CDR2) y los residuos 89-97 (L-CDR3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

10 Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "anticuerpo humano" tal y como se usa en esta memoria, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanos de la presente descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio, *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal y como se usa en esta memoria, no se entiende que incluya anticuerpos en los que las secuencias de CDRs obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas.

15 Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "Ac monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "AcMo", o similares, tal y como se usan en esta memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo con una composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad hacia un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

20 De acuerdo con la presente descripción, la región VH del anticuerpo C2 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 que se define como se indica a continuación y la secuencia numerada de Kabat se define en la Tabla A.

SEQ ID NO: 1

EVQLVESGGSLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNSYMNWVRQAPGKGLEWISSIYG

SSRYIDYADFKVGRFTISRDNATNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSSSYYGSG

25 MDVWGRGTLVTVSS

Posición en SEQ ID NO:1	Numeración de Kabat	Aminoácido
1	H1	E
2	H2	V
3	H3	Q
4	H4	L
5	H5	V
6	H6	E
7	H7	S
8	H8	G
9	H9	G
10	H10	S
11	H11	L
12	H12	V
13	H13	K
14	H14	P
15	H15	G

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:1	Numeración de Kabat	Aminoácido
16	H16	G
17	H17	S
18	H18	L
19	H19	R
20	H20	L
21	H21	S
22	H22	C
23	H23	A
24	H24	A
25	H25	S
26	H26	G
27	H27	F
28	H28	T
29	H29	F
30	H30	S
31	<u>H31</u>	N
32	<u>H32</u>	S
33	<u>H33</u>	Y
34	<u>H34</u>	M
35	<u>H35</u>	N
36	H36	W
37	H37	V
38	H38	R
39	H39	Q
40	H40	A
41	H41	P
42	H42	G
43	H43	K
44	H44	G
45	H45	L
46	H46	E
47	H47	W

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:1	Numeración de Kabat	Aminoácido
48	H48	I
49	H49	S
50	<u>H50</u>	S
51	<u>H51</u>	I
52	<u>H52</u>	Y
53	<u>H52A</u>	G
54	<u>H53</u>	S
55	<u>H54</u>	S
56	<u>H55</u>	R
57	<u>H56</u>	Y
58	<u>H57</u>	I
59	<u>H58</u>	D
60	<u>H59</u>	Y
61	<u>H60</u>	A
62	<u>H61</u>	D
63	<u>H62</u>	F
64	<u>H63</u>	V
65	<u>H64</u>	K
66	<u>H65</u>	G
67	H66	R
68	H67	F
69	H68	T
70	H69	I
71	H70	S
72	H71	R
73	H72	D
74	H73	N
75	H74	A
76	H75	T
77	H76	N
78	H77	S
79	H78	L

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:1	Numeración de Kabat	Aminoácido
80	H79	Y
81	H80	L
82	H81	Q
83	H82	M
84	H82A	N
85	H82B	S
86	H82C	L
87	H83	R
88	H84	A
89	H85	E
90	H86	D
91	H87	T
92	H88	A
93	H89	V
94	H90	Y
95	H91	Y
96	H92	C
97	H93	V
98	H94	R
99	<u>H95</u>	S
100	<u>H96</u>	S
101	<u>H97</u>	S
102	<u>H98</u>	Y
103	<u>H99</u>	Y
104	<u>H100</u>	G
105	<u>H100A</u>	S
106	<u>H100B</u>	G
107	<u>H100C</u>	M
108	<u>H101</u>	D
109	<u>H102</u>	V
110	H103	W
111	H104	G

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:1	Numeración de Kabat	Aminoácido
112	H105	R
113	H106	G
114	H107	T
115	H108	L
116	H109	V
117	H110	T
118	H111	V
119	H112	S
120	H113	S

Tabla A: Secuencia numerada de Kabat del dominio VH de C2

Por consiguiente, la H-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 31 hasta el residuo de aminoácido en la posición 35 en SEQ ID NO: 1.

- 5 En consecuencia, la H-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 50 hasta el residuo de aminoácido en la posición 66 en SEQ ID NO: 1.

Por consiguiente, la H-CDR3 de C2 se define por la secuencia que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 99 hasta el residuo de aminoácido en la posición 109 en SEQ ID NO: 1.

- 10 De acuerdo con la presente descripción, la región VL del anticuerpo C2 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2 que se define como se indica a continuación y la secuencia numerada de Kabat se define en la Tabla B.

SEQ ID NO: 2:

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYGSVSWYQQHPGKAPKLMIIYD
 SYRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSNTNSSTRVFGGGTKL
 AVLG

Posición en SEQ ID NO:2	Numeración de Kabat	Aminoácido
1	L1	Q
2	L2	S
3	L3	V
4	L4	L
5	L5	T
6	L6	Q
7	L7	P
8	L8	A
9	L9	S
	L10	-
10	L11	V

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:2	Numeración de Kabat	Aminoácido
11	L12	S
12	L13	G
13	L14	S
14	L15	P
15	L16	G
16	L17	Q
17	L18	S
18	L19	I
19	L20	T
20	L21	I
21	L22	S
22	L23	C
23	<u>L24</u>	A
24	<u>L25</u>	G
25	<u>L26</u>	T
26	<u>L27</u>	S
27	<u>L27A</u>	S
28	<u>L27B</u>	D
29	<u>L27C</u>	V
30	<u>L28</u>	G
31	<u>L29</u>	G
32	<u>L30</u>	S
33	<u>L31</u>	N
34	<u>L32</u>	Y
35	<u>L33</u>	V
36	<u>L34</u>	S
37	L35	W
38	L36	Y
39	L37	Q
40	L38	Q
41	L39	H
42	L40	P

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:2	Numeración de Kabat	Aminoácido
43	L41	G
44	L42	K
45	L43	A
46	L44	P
47	L45	K
48	L46	L
49	L47	M
50	L48	I
51	L49	Y
52	<u>L50</u>	S
53	<u>L51</u>	D
54	<u>L52</u>	S
55	<u>L53</u>	Y
56	<u>L54</u>	R
57	<u>L55</u>	P
58	<u>L56</u>	S
59	L57	G
60	L58	V
61	L59	S
62	L60	N
63	L61	R
64	L62	F
65	L63	S
66	L64	G
67	L65	S
68	L66	K
69	L67	S
70	L68	G
71	L69	N
72	L70	T
73	L71	A
74	L72	S

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:2	Numeración de Kabat	Aminoácido
75	L73	L
76	L74	T
77	L75	I
78	L76	S
79	L77	G
80	L78	L
81	L79	Q
82	L80	A
83	L81	E
84	L82	D
85	L83	E
86	L84	A
87	L85	D
88	L86	Y
89	L87	Y
90	L88	C
91	<u>L89</u>	S
92	<u>L90</u>	S
93	<u>L91</u>	Y
94	<u>L92</u>	T
95	<u>L93</u>	Y
96	<u>L94</u>	Y
97	<u>L95</u>	S
98	<u>L95A</u>	T
99	<u>L96</u>	R
100	<u>L97</u>	V
101	L98	F
102	L99	G
103	L100	G
104	L101	G
105	L102	T
106	L103	K

ES 2 743 950 T3

Posición en SEQ ID NO:2	Numeración de Kabat	Aminoácido
107	L104	L
108	L105	A
109	L106	V
110	L106A	L
111	L107	G

TABLA B: Secuencia numerada de Kabat del dominio VL de C2

En consecuencia, la L-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 23 hasta el residuo de aminoácido en la posición 36 en SEQ ID NO: 2.

- 5 En consecuencia, la L-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 52 hasta el residuo de aminoácido en la posición 58 en SEQ ID NO: 2.

En consecuencia, la L-CDR3 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 91 hasta el residuo de aminoácido en la posición 100 en SEQ ID NO: 2.

- 10 Por lo tanto, la presente descripción proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDRs de C2. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción, todavía permite que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original (es decir, el anticuerpo C2) y, en algunos casos, un anticuerpo monoclonal humano de ese tipo de la presente descripción puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el Ac original. Esas variantes funcionales conservan normalmente una identidad de secuencia significativa con el Ac original. La secuencia de variantes de una CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias de anticuerpos originales a través de sustituciones principalmente conservadoras; por ejemplo, al menos aproximadamente 35%, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más, aproximadamente 90% o más, (por ejemplo, aproximadamente 65-95%, tal como aproximadamente 92%, 93% o 94%) de las sustituciones en la variante son sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos. Las secuencias de las variantes de CDRs pueden diferir de la secuencia de las CDRs de las secuencias de los anticuerpos originales a través de sustituciones principalmente conservadoras; por ejemplo, al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos. En el contexto de la presente descripción, las sustituciones conservadoras se pueden definir por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas del modo siguiente:

Residuos alifáticos I, L, V y M

Residuos asociados a cicloalqueno F, H, W e Y

Residuos hidrófobos A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y

- 30 Residuos cargados negativamente D y E

Residuos polares C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T

Residuos cargados positivamente H, K y R

Residuos pequeños A, C, D, G, N, P, S, T y V

Residuos muy pequeños A, G y S

- 35 Residuos involucrados en el giro A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y la formación T

Residuos flexibles Q, T, K, S, G, P, D, E y R

- 40 Las agrupaciones de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Una conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y peso/tamaño del residuo también se conserva sustancialmente en una CDR variante en comparación con una CDR de C2. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína, se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático

relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de su hidrofobicidad y sus características de carga, los cuales 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). La conservación de residuos similares también se puede medir, o medir alternativamente, mediante una puntuación de la similitud, según se determina mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI que emplea configuraciones estándar BLOSUM62, hueco abierto = 11 y hueco extendido = 1). Las variantes adecuadas normalmente muestran al menos aproximadamente un 70% de identidad con el péptido original.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones en la H-CDR1 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 sustituciones en la H-CDR2 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones en la H-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 sustituciones en la L-CDR1 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones en la L-CDR2 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituciones en la L-CDR3 de C2.

De acuerdo con la presente descripción, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos, significa que la primera secuencia tiene 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. De acuerdo con la presente descripción, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos, significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR1 de C2, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR2 de C2 y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR1 de C2, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR2 de C2 y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR1 de C2, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR2 de C2 y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 50% de identidad con la H-CDR3 de C2 y una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR1 de C2, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR2 de C2 y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 50% de identidad con la L-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de C2, ii) la H-CDR2 de C2 y iii) la H-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de C2, ii) la L-CDR2 de C2 y iii) la L-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de C2, ii) la H-CDR2 de C2 y iii) la H-CDR3 de C2 y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de C2, ii) la L-CDR2 de C2 y iii) la L-CDR3 de C2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 2.
- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 2.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo que comprende una cadena ligera idéntica a SEQ ID NO: 2.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención es un anticuerpo que comprende una cadena pesada idéntica a SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera idéntica a SEQ ID NO: 2.
- El anticuerpo de la presente descripción se puede caracterizar por una o más de las características funcionales o estructurales de los aspectos descritos anteriormente, o por cualquier combinación de características funcionales y estructurales seleccionadas.
- 15 El anticuerpo de la presente descripción puede tener cualquier isotipo. La elección del isotipo generalmente se guiará por las funciones efectoras deseadas, como la inducción de ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede cambiar por métodos conocidos. Las técnicas típicas para el cambio de clase se pueden usar para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se puede cambiar mediante un cambio del isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG4 específico de OX1R es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Los ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos en los que la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU así como en Kabat et al. supra, se sustituye con lisina, treonina, metionina o leucina, preferiblemente lisina (se describe en el documento WO2006033386) y/o en donde la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys. Otros anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados se describen en el documento WO2008145142. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es un anticuerpo de tipo no IgG4, p. ej., IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de tal manera que la capacidad para mediar en funciones efectoras, tales como ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Esas mutaciones se han descrito, por ejemplo, en Dall'Acqua WF et al., *J Immunol.* 177(2): 1129-1138 (2006) y Hezareh M, *J Virol.* 75(24): 12161-12168 (2001).
- 30 Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de la región estructural o CDR, los anticuerpos de la presente descripción se pueden diseñar para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, como la semivida en suero, la fijación de complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede modificar químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden fijar al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente descripción se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente descripción que tienen una afinidad mejorada hacia OX1R. Esas variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración por afinidad, incluyendo la mutación de las CDRs (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), la mezcla aleatoria de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), la mezcla aleatoria de ADN (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), la presentación en fagos (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) describen estos métodos de maduración por afinidad.
- 45 En algunas realizaciones, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que se altera el número de residuos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento de Patente estadounidense nº 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.
- 50 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en el documento de Patente estadounidense nº 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de

la región CH1 o CL para contener un epítipo que se une al receptor de rescate tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en los documentos de Patente estadounidense nº 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

5 En algunas realizaciones, la región Fc se altera al reemplazar al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tiene una afinidad alterada hacia un ligando efector pero conserva la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en los documentos de Patente estadounidense nº 5.624.821 y 5.648.260, ambos de Winter et al.

En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos se pueden reemplazar con un residuo de aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tiene una unión a C2q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o eliminada. Este enfoque se describe con más detalle en los documentos de Patente estadounidense nº 6.194.551 de Idusogie et al.

15 En algunas realizaciones, se alteran uno o más residuos de aminoácidos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe más adelante en el documento de publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En algunas realizaciones, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia un receptor de Fc, modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en el documento de publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han cartografiado los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem 276: 6591-6604, documento WO2010106180).

25 En algunas realizaciones, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Esas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación estructurales de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Una aglicosilación de ese tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Ese enfoque se describe con más detalle en los documentos de Patente estadounidense nº 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al. Adicional o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo de modo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o que no tenga residuos de fucosilo, o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNac bisectantes incrementadas. Se ha demostrado que esos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Esas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con la maquinaria de la glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de la glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células hospedadoras en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la presente descripción para producir de ese modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en esa línea celular muestran una hipofucosilación o carecen de residuos de fucosilo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se pueden producir mediante una expresión recombinante en una línea celular que muestra un patrón de hipofucosilación o de no fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con una expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. El documento de publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con una capacidad reducida para fijar la fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), lo que también da lugar a una hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem 277: 26733-26740). El documento de publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas que modifican glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que esos anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas muestran estructuras de GlcNac bisectantes incrementadas, lo que da lugar a una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Eureka Therapeutics describe además células de mamífero CHO modificadas genéticamente capaces de producir anticuerpos con un patrón de glicosilación de mamífero alterado sin residuos de fucosilo (http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos diseñados para tener un patrón de glicosilación similar a un mamífero y ser capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

60 Otra modificación de los anticuerpos de esta memoria que se contempla en la presente descripción es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegar, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, reacciona normalmente con polietilenglicol (PEG), como un éster reactivo o un derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más

grupos del PEG se fijan al anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal y como se usa en esta memoria, el término "polietilenglicol" se entiende que incluye cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (Cl-CIO) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 de Nishimura et al. y EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la presente descripción es un conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región que se une a antígeno del anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción, con proteína sérica, tal como albúmina de suero humano o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante. Un enfoque de ese tipo se describe, por ejemplo, en Ballance et al., documento EP0322094.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento que se une a antígeno. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante técnicas convencionales, tales como la fragmentación de anticuerpos de longitud completa o mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de anticuerpos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Después, los fragmentos se pueden analizar o escrutar para determinar sus propiedades de la misma manera que se describe en esta memoria para los anticuerpos de longitud completa. A continuación se describen formatos ejemplares para fragmentos que se unen a antígeno específicos de OX1R de la presente descripción:

- Fragmentos F(ab')₂, que son fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. Estos se pueden generar, por ejemplo, tratando un anticuerpo de longitud completa con pepsina.
- Fragmentos Fab' o Fab, que son fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH1. Los fragmentos Fab se pueden obtener, por ejemplo, tratando un anticuerpo IgG con papaína. Los fragmentos Fab' se pueden obtener, por ejemplo, reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂ usando un agente reductor tal como ditiotreitól.
- Fragmentos Fd, que consisten esencialmente en los dominios VH y CH1.
- Fragmentos Fv, que consisten esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo y anticuerpos de cadena sencilla del mismo. Los anticuerpos de cadena sencilla (también conocidos como anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv)) son estructuras artificiales en las que los dominios VL y VH de un fragmento Fv se unen, utilizando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite expresarse como una cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)).
- Fragmentos que comprenden o consisten en las cadenas VL o VH, así como la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción, molécula descrita anteriormente en este documento, y al menos un segundo sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno se usa para reclutar un mecanismo de destrucción tal como, por ejemplo, mediante la unión a un antígeno sobre una célula efectora humana o mediante la unión a un agente citotóxico o un segundo agente terapéutico. Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T que incluyen linfocitos T citolíticos (CTLs)), células citotóxicas, células citotóxicas naturales, macrófagos, monocitos, mastocitos y granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos (FcRs) y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, tal como una célula citotóxica natural. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcRs, están involucrados en una destrucción específica de las células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular sobre una célula efectora puede estar regulada por factores humorales tales como las citocinas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o fagocitar o lisar una célula diana. Los agentes citotóxicos adecuados y los segundos agentes terapéuticos se ejemplifican a continuación, e incluyen toxinas (tales como péptidos radiomarcados), agentes quimioterapéuticos y profármacos.

En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno sobre un linfocito B humano, tal como, por ejemplo, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD80, CD138 y HLA-DR.

En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno específico de tejido, favoreciendo la ubicación del anticuerpo biespecífico en un tejido específico.

En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno ubicado en el mismo tipo de célula que la célula que expresa OX1R, normalmente un antígeno asociado a un tumor (TAA), pero tiene una especificidad de unión diferente de la del primer sitio de unión a antígeno. Tales anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos pueden mejorar la especificidad de la unión de las células tumorales y/o establecer múltiples rutas efectoras. Los TAAs ejemplares incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), RAGE (antígeno renal), a-fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTLs en un melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE y SAGE), antígenos de mucina (p. ej., MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de gangliósidos, tirosinasa, gp75, c-Met, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM o una integrina asociada al cáncer, como la integrina $\alpha 5\beta 3$. Alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un epitopo diferente de OX1R. El segundo sitio de unión a antígeno se puede unir alternativamente a un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado al cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de ellos, particularmente receptores asociados con la progresión del cáncer, como el receptor HER (EGFR, HER2, HER3 o HER4), c-MET o IGF1R.

En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno procede de un segundo anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción, tal como un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción.

Los formatos ejemplares para las moléculas de anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a (i) dos anticuerpos reticulados mediante heteroconjugación química, uno con especificidad para OX1R y otro con especificidad para un segundo antígeno; (ii) un único anticuerpo que comprende dos regiones diferentes de unión a antígeno; (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que comprende dos regiones diferentes de unión a antígeno, por ejemplo, dos scFvs unidos en tándem por un enlazador peptídico extra; (iv) un anticuerpo de dominio doble variable (DVD-Ig), en donde cada cadena ligera y cada cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab')₂ biespecífico ligado químicamente; (vi) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vii) un flexicuerpo que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (viii) una molécula denominada de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína cinasa A, que, cuando se aplica a los Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fabs idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una molécula denominada escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFvs fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (x) un diacuerpo. Otro formato ejemplar para los anticuerpos biespecíficos son moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización. Esas moléculas se pueden preparar utilizando tecnologías conocidas tales como, por ejemplo, las tecnologías conocidas como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) y emparejamiento electrostático (Amgen), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se obtiene o es obtenible a través de un intercambio controlado del brazo Fab, normalmente usando tecnología DuoBody. Los métodos *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio controlado del brazo Fab se han descrito en los documentos WO2008119353 y WO 2011131746 (ambos de Genmab A/S). En un método ejemplar, descrito en el documento WO 2008119353, un anticuerpo biespecífico se forma mediante el intercambio del "brazo Fab" o "semimolécula" (trueque de una cadena pesada y una cadena ligera fijada) entre dos anticuerpos mono-específicos, en donde ambos comprenden regiones CH3 similares a IgG4, después de una incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender secuencias diferentes. En otro método ejemplar, descrito en el documento WO 2011131746, los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción se preparan mediante un método que comprende las siguientes etapas, en donde al menos uno de los anticuerpos primero y segundo es un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción: a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, en donde dicha región Fc comprende una primera región CH3; b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, en donde dicha región Fc comprende una segunda región CH3; en donde las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3; c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras; y d) obtener dicho anticuerpo biespecífico, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión diferente, o viceversa. Las condiciones reductoras se pueden proporcionar, por ejemplo, añadiendo un agente reductor, p. ej., seleccionado a partir de 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina. La etapa d) puede comprender además restaurar las condiciones para que sean no reductoras o menos reductoras, por ejemplo, mediante la eliminación de un agente reductor, p. ej., desalando. Preferiblemente, las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 son diferentes, y comprenden solo unas pocas mutaciones asimétricas bastante conservadoras, de modo que la interacción

heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. Se proporcionan más detalles sobre esas interacciones y cómo se pueden lograr, en el documento WO 2011131746. Las siguientes son realizaciones ejemplares de combinaciones de tales mutaciones asimétricas, opcionalmente en donde una o ambas regiones Fc tienen el isotipo IgG1.

5 En algunas realizaciones, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y la segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y en donde las regiones Fc primera y segunda no están sustituidas en las mismas posiciones.

10 En algunas realizaciones, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 405, y dicha segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409, opcionalmente 409.

15 En algunas realizaciones, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 409, y dicha segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407, opcionalmente 405 o 368.

En algunas realizaciones, tanto la primera como la segunda región Fc tienen el isotipo IgG1, en donde la primera región Fc tiene una Leu en la posición 405, y la segunda región Fc tiene una Arg en la posición 409.

20 El anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación. Por ejemplo, conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, mediante técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar usando un método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la presente descripción se pueden sintetizar mediante métodos de ADN recombinante bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener como productos de expresión del ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de esos vectores en hospedadores eucariotas o procariontes adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales se pueden aislar a continuación, usando técnicas bien conocidas

30 Por consiguiente, un objeto adicional de la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención.

35 Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en cualquier vector adecuado. El término "vector", tal y como se usa en esta memoria, se entiende que se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (como los vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Esos vectores se denominan en esta memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada. Sin embargo, la presente descripción se entiende que incluye esas otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores víricos (tales como retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con una replicación defectuosa), que cumplen funciones equivalentes.

50 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención.

55 Esos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen un promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y et al. 1987), el promotor (Mason JO et al. 1985) y el potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares. Se puede usar cualquier vector de expresión para

células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifica la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSGI beta d2-4- (Miyaji H et al. 1990) y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcADN, pBR y similares. Otros ejemplos de vectores víricos incluyen vectores adenovíricos retrovíricos, de virus del herpes y VAA. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante una transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen las células PA317, células PsiCRIP, células GEnv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir esos virus recombinantes con una replicación defectuosa, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

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

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

Los ácidos nucleicos de la presente descripción se pueden emplear para producir un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño, transportado por el vector e introducido en la célula hospedadora. Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedadoras de insecto y vectores del baculovirus, y células hospedadoras y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (como bacterias) y células eucariotas (como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (p. ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamífero primarios o establecidos (p. ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al.; 1980), células YB2/3HL.P2.G1 1.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, en lo sucesivo denominadas "células YB2/0"), y similares.

La presente descripción también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, en donde dicho método comprende 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. Esas células hospedadoras recombinantes se pueden usar para la producción de anticuerpos de la presente descripción.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo monoclonal humano de la presente invención, tal y como se define en cualquier aspecto o realización de la presente memoria, para uso como un medicamento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita.

Tal y como se usa en esta memoria, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, disminuir la extensión de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de uno o más medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia. El "tratamiento" también incluye una reducción de las consecuencias patológicas del cáncer. Los métodos de la presente descripción contemplan uno cualquiera o más de estos aspectos del tratamiento.

Normalmente, el cáncer se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en cáncer de conducto biliar (por ejemplo, cáncer perihilar, cáncer del conducto biliar distal, cáncer del conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de hueso (por ejemplo, osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixioide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y del sistema nervioso central (p. ej., meningioma, astrocitoma,

oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (p. ej., carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma infiltrante lobular, carcinoma lobular *in situ*, ginecomastia), enfermedad de Castleman (p. ej., hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolliculares), cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (p. ej., adenocarcinoma endometrial, adenocantoma, adenocarcinoma seroso papilar, células claras), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (p. ej., coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (p. ej., cáncer de células renales), cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado (p. ej., hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal (p. ej., esteseoneuroblastoma, granuloma de la línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomyosarcoma (p. ej., rabdomyosarcoma embrionario, rabdomyosarcoma alveolar, rabdomyosarcoma pleomórfico), cáncer de glándulas salivares, cáncer de piel (p. ej., melanoma, cáncer de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (p. ej., seminoma, cáncer de células germinales no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular de tiroides, linfoma de tiroides), cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer uterino (p. ej., leiomyosarcoma uterino).

En algunas realizaciones, el sujeto padece un cáncer epitelial. Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "cáncer epitelial" se refiere a cualquier proceso maligno que tiene un origen epitelial. Ejemplos de cánceres epiteliales incluyen, pero no se limitan a, un cáncer ginecológico tal como cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vulva, cáncer de útero o cáncer de trompa de Falopio, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de sistema urinario, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer oral, cáncer colorrectal y cáncer de hígado. Un cáncer epitelial puede estar en diferentes estadios, así como en diferentes grados de clasificación histológica. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial se selecciona a partir del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal y cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es un cáncer de hígado, en particular un carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de próstata, en particular cáncer de próstata avanzado. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer epitelial es carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "cáncer pancreático" o "cáncer de páncreas" tal y como se usa en esta memoria se refiere a un cáncer que se deriva de células pancreáticas. En particular, el cáncer de páncreas incluye adenocarcinoma de páncreas (p. ej., adenocarcinoma ductal pancreático), así como otros tumores del páncreas exocrino (p. ej., cistadenomas serosos), cánceres de células acinares, neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN) y tumores neuroendocrinos pancreáticos (tales como insulinosomas).

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "carcinoma hepatocelular" tiene su significado general en la técnica y se refiere al cáncer desarrollado en los hepatocitos. En general, el cáncer de hígado indica un carcinoma hepatocelular en general. El CHC puede estar causado por un agente infeccioso como el virus de la hepatitis B (VHB, en adelante denominado VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC, en adelante denominado VHC). En algunas realizaciones, el CHC es el resultado de una esteatohepatitis alcohólica o una esteatohepatitis no alcohólica (en lo sucesivo se puede abreviar como "NASH"). En algunas realizaciones, el CHC es CHC en un estadio temprano, CHC no metastásico, CHC primario, CHC avanzado, CHC localmente avanzado, CHC metastásico, CHC en remisión o CHC recurrente. En algunas realizaciones, el CHC se puede extirpar de forma localizada (es decir, tumores que están confinados a una porción del hígado que permite una extirpación quirúrgica completa), no se puede extirpar de forma localizada (es decir, los tumores localizados puede que no se puedan extirpar porque están implicadas estructuras de vasos sanguíneos cruciales o porque el hígado está deteriorado) o no se puede extirpar (es decir, los tumores afectan a todos los lóbulos del hígado y/o se ha extendido afectando a otros órganos (p. ej., pulmón, ganglios linfáticos, hueso). En algunas realizaciones, el CHC es, según las clasificaciones TNM, un tumor en estadio I (tumor único sin invasión vascular), un tumor en estadio II (tumor único con invasión vascular o tumores múltiples, ninguno mayor de 5 cm), un tumor en estadio III (tumores múltiples, cualquiera mayor de 5 cm, o tumores que involucran una ramificación principal de las venas porta o hepática), un tumor en estadio IV (tumores con invasión directa de los órganos adyacentes que no sean la vesícula biliar o perforación del peritoneo visceral), tumor N1 (metástasis en los ganglios linfáticos regionales) o tumor M1 (metástasis distante). En algunas realizaciones, el CHC es, según los criterios de estadificación de la AJCC (Comisión Conjunta Estadounidense sobre el Cáncer), CHC en estadio T1, T2, T3 o T4.

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "cáncer de próstata avanzado" tiene su significado general en la técnica. "Cáncer de próstata resistente a la castración", "CaP", "cáncer de próstata dependiente del receptor de andrógenos", "cáncer de próstata independiente de andrógenos", se usan indistintamente para referirse al cáncer de próstata en el que las células del cáncer de próstata "crecen" (es decir, aumentan en número) en ausencia de andrógenos y/o en ausencia de una expresión de los receptores de andrógenos en las células cancerosas.

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y de la capacidad del anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la porción de anticuerpo. Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción dependen de la enfermedad o afección que se va a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la materia. Un médico con una experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría comenzar con dosis del anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción empleadas en la composición farmacéutica, a niveles inferiores a las requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente descripción será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico de acuerdo con un régimen de dosificación particular. Tal dosis eficaz, generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz para uso terapéutico se puede medir por su capacidad para estabilizar la progresión de una enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer, por ejemplo, se puede evaluar en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esa propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir citotoxicidad mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica podrá determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada. Un intervalo no limitativo, ejemplar para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5, como aproximadamente 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 8 mg/kg. Un intervalo no limitativo ejemplar para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es 0,02-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,05-10 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5-2 mg/kg. La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, administrarse de forma proximal al sitio de la diana. Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento se vigila durante la terapia, p. ej., en puntos predefinidos en el tiempo. En algunas realizaciones, la eficacia se puede vigilar midiendo el nivel de OX1R en una muestra que contiene células tumorales, mediante la visualización del área de la enfermedad o mediante otros métodos de diagnóstico descritos más adelante en este documento, p. ej., realizando una o más exploraciones PET-CT, por ejemplo usando un anticuerpo monoclonal humano marcado de la presente descripción, un fragmento o un mini-anticuerpo obtenido a partir del anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción. Si se desea, una dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se administran mediante una infusión lenta y continua durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, con el fin de minimizar cualquier efecto secundario no deseado. Una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción también se puede administrar usando un período de dosificación semanal, quincenal o trisemanal. El período de dosificación se puede restringir, por ejemplo, a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido una progresión clínica. Como ejemplos no limitantes, un tratamiento de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar como una dosificación diaria de un compuesto de la presente descripción en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o alternativamente, en al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de las mismas.

La presente descripción también proporciona aplicaciones terapéuticas en las que se emplea un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción en combinación con al menos un agente terapéutico adicional para tratar un cáncer. Esa administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para una administración simultánea, los agentes se pueden administrar como una composición o como composiciones distintas, según sea apropiado.

El agente terapéutico adicional es normalmente relevante para el trastorno que se va a tratar. Los agentes

terapéuticos ejemplares incluyen otros anticuerpos anticancerígenos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inmunógenos anticancerígenos, agentes reguladores del control del ciclo celular/apoptosis, agentes reguladores hormonales y otros agentes descritos a continuación.

5 En un aspecto, el agente terapéutico adicional es al menos un segundo anticuerpo que se une a otra diana tal como, por ejemplo, CC2, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CC20, CC20L, CC26, CD52, CD54, CD80, CD126, B7, MUC1, tenascina, HM 1.24 o HLA-DR. Por ejemplo, el segundo anticuerpo se puede unir a un antígeno de linfocitos B, que incluye, entre otros, CD20, CD19, CD21, CD23, CD38, CC26, CD80, CD138, HLA-DR, CD22 u otro epítipo en OX1R. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción es para usar en combinación con un anticuerpo terapéutico específico. Los anticuerpos monoclonales utilizados actualmente como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que son adecuados para una inclusión en las combinaciones de la presente descripción, incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetán (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®) y BL22. Otros ejemplos incluyen anticuerpos anti-CTLA4 (por ejemplo, Ipilimumab), anticuerpos anti-PDI, anticuerpos anti-PDL1, anticuerpos anti-TIMP3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4 o anticuerpos anti-B7H6. En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen anticuerpos que agotan los linfocitos B. Los anticuerpos típicos que agotan los linfocitos B incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales anti-CD20 [p. ej. Rituximab (Roche), Ibritumomab tiuxetán (Bayer Schering), Tositumomab (GlaxoSmithKline), AME-133v (Applied Molecular Evolution), Ocrelizumab (Roche), Ofatumumab (HuMax-CD20, Gemnab), TRU-015 (Trubion) e IMMUN-106 (Immunomedics)], un anticuerpo anti-CD22 [p. ej., Epratuzumab, Leonard et al., *Clinical Cancer Research* (Z004) 10: 5327-5334], anticuerpos anti-CD79a, anticuerpos anti-CD27 o anticuerpos anti-CD19 (p. ej., el documento de Pat. de EE.UU. n° 7.109.304), anticuerpos anti-BAFF-R (por ejemplo, Belimumab, GlaxoSmithKline), anticuerpos anti-APRIL (por ejemplo, anticuerpo anti-APRIL humano, ProSci inc.) y anticuerpos anti-IL-6 [por ejemplo, como los descritos previamente por De Benedetti et al., *J Immunol* (2001) 166: 4334-4340 y por Suzuki et al., *Europ J de Immunol* (1992) 22 (8) 1989-1993].

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos químicos que son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (que incluye el topotecán análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estrarnustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimus tine, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como los antibióticos enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina 11 y calicheamicina 211, véase, por ejemplo, *Agnew Chem Intl. Ed. Engl.* 33:183-186 (1994); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caninomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idanrubina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalarnicina, olivomicinas, peplomicina, potfromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfarnida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguantrona; moxidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogenanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobromtol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina;

aminopterin; xeloda; ibandronato; CPT-1 1; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con una terapia dirigida contra el cáncer. Las terapias dirigidas contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la propagación del cáncer al interferir con moléculas específicas ("dianas moleculares") que participan en el crecimiento, la progresión y la propagación del cáncer. Las terapias dirigidas contra el cáncer a veces se denominan "fármacos dirigidos molecularmente", "terapias dirigidas molecularmente", "medicamentos de precisión" o nombres similares. En algunas realizaciones, la terapia dirigida consiste en administrar al sujeto un inhibidor de la tirosina cinasa. La expresión "inhibidor de la tirosina cinasa" se refiere a cualquiera entre una variedad de agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de tirosina cinasas de un receptor y/o de un no receptor. Los inhibidores de la tirosina cinasa y los compuestos relacionados son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento de publicación de EE.UU. 2007/0254295. Un experto en la materia apreciará que un compuesto relacionado con un inhibidor de la tirosina cinasa recapitulará el efecto del inhibidor de la tirosina cinasa, por ejemplo, el compuesto relacionado actuará sobre un miembro diferente de la ruta de señalización de la tirosina cinasa para producir el mismo efecto que tendría un inhibidor de la tirosina cinasa de esa tirosina cinasa. Ejemplos de inhibidores de la tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para un uso en métodos de realizaciones de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, dasatinib (BMS-354825), PP2, BEZ235, saracatinib, gefitinib (Iressa), sunitinib (Sutent; SU11248), erlotinib (Tarceva; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec; STI571), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 (clorohidrato de 8-[4-aminociclobutil]fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-ona), derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Inhibidores adicionales de la tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para uso en la presente descripción, se describen, por ejemplo, en los documentos de publicación de patente de EE.UU. 2007/0254295, patentes de EE.UU. n.º 5.618.829, 5.639.757, 5.728.868, 5.804.396, 6.100.254, 6.127.374, 6.245.759, 6.306.874, 6.313.138, 6.316.444, 6.329.380, 6.344.459, 6.420.382, 6.479.512, 6.498.165, 6.544.988, 6.562.818, 6.586.423, 6.586.424, 6.740.665, 6.794.393, 6.875.767, 6.927.293 y 6.958.340. En algunas realizaciones, el inhibidor de la tirosina cinasa es un inhibidor de cinasas de molécula pequeña que se ha administrado por vía oral y que ha sido objeto de al menos un ensayo clínico de fase I, más preferiblemente al menos un ensayo clínico de fase II, incluso más preferiblemente al menos un ensayo clínico de fase III, y lo más preferiblemente que esté aprobado por la FDA para al menos una indicación hematológica u oncológica. Ejemplos de tales inhibidores incluyen, entre otros, Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Canertinib, BMS-599626 (AC-480), Neratinib, KRN-633, CEP-11981, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, AZM-475271, CP-724714, TAK-165, Sunitinib, Vatalanib, CP-547632, Vandetanib, Bosutinib, Lestaurtinib, Tandutinib, Midostaurin, Enzastaurin, AEE-788, Pazopanib, Axitinib, Motesanib, OSI-930, Cediranib, KRN-951, Dovitinib, Seliciclib, SNS-032, PD-0332991, MKC-I (Ro-317453; R-440), Sorafenib, ABT-869, Brivanib (BMS-582664), SU-14813, Telatinib, SU-6668, (TSU-68), L-21649, MLN-8054, AEW-541 y PD-0325901.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con un inhibidor de HER. En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un inhibidor de EGFR. Los inhibidores de GFR son bien conocidos en la técnica (inhibidores de la cinasa erbB-1; Expert Opinion on Therapeutic Patents Dic 2002, Vol. 12, n.º 12, páginas 1903-1907, Susan E Kane. Cancer therapies targeted to the epidermal growth factor receptor and its family members. Expert Opinion on Therapeutic Patents Feb 2006, Vol. 16, n.º 2, páginas 147-164. Peter TrOX1Rer Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment (Part II). Expert Opinion on Therapeutic Patents Dic 1998, Vol. 8, n.º 12, páginas 1599-1625). Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y pequeñas moléculas orgánicas que se unen al EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, el documento de Pat. de EE.UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y sus variantes, como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo totalmente humano dirigido contra EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (documento de Pat. de EE.UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en el documento de Pat. de EE.UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunocóncugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de pequeñas moléculas orgánicas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 o erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200. En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un inhibidor de pan-HER de molécula orgánica pequeña tal como dacomitinib (PF-00299804). En algunas realizaciones, el inhibidor de HER se selecciona a partir del grupo que consiste en

5 cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib, afatinib, TAK-285 (inhibidor doble de HER2 y EGFR), ARRY334543 (inhibidor doble de HER2 y EGFR), Dacomitinib (inhibidor de pan-ErbB), OSI-420 (desmetil erlotinib) (inhibidor de EGFR), AZD8931 (inhibidor de EGFR, HER2 y HER3), AEE788 (NVP-AEE788) (inhibidor de EGFR, HER2 y VEGFR 1/2), Pelitinib (EKB-569) (inhibidor de pan-ErbB), CUDC-101 (inhibidor de EGFR, HER2 y HDAC), XL647 (inhibidor doble de HER2 y EGFR), BMS-599626 (AC480) (inhibidor doble de HER2 y EGFR), PKC412 (EGFR, PKC, proteína cinasa dependiente de AMP cíclico e inhibidor de la cinasa S6), BIBX1382 (inhibidor de EGFR) y AP261 13 (inhibidor de ALK y EGFR). Los inhibidores cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab son anticuerpos monoclonales, erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib y afatinib son inhibidores de la tirosina cinasa.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con un inhibidor de c-Met. En algunas realizaciones, el inhibidor de c-Met es un anticuerpo anti-c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es MetMAB (onartuzumab) o una versión biosimilar del mismo. MetMAB se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/015371; Jin et al., Cancer Res (2008) 68:4360. Otros anticuerpos anti-c-met adecuados para usar en los métodos de la presente descripción se describen en esta memoria y se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos anti-c-met descritos en el documento WO05/016382 (incluyendo, pero sin limitarse a, los anticuerpos 13.3.2, 9.1.2, 8.70.2, 8.90.3); anticuerpos anti-c-met producidos por la línea celular de hibridoma depositada con el número ICLC PD 03001 en el CBA en Génova, o que reconoce un epítipo en el dominio extracelular de la cadena β del receptor de HGF, y dicho epítipo es el mismo que el reconocido por el anticuerpo monoclonal); anticuerpos anti-c-met descritos en el documento WO2007/126799 (incluyendo, pero sin limitarse a, 04536, 05087, 05088, 05091, 05092, 04687, 05097, 05098, 05100, 05101, 04541, 05093, 05094, 04537, 05102, 05105, 04696, 04682); anticuerpos anti-c-met descritos en el documento WO2009/007427 (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 14 de marzo de 2007 con el número 1-3731, el 14 de marzo de 2007 con el número 1-3732, el 6 de julio de 2007 con el número 1-3786, el 14 de marzo de 2007 con el número 1-3724; un anticuerpo anti-c-met descrito en el documento 20110129481; un anticuerpo anti-c-met descrito en el documento US20110104176; un anticuerpo anti-c-met descrito en el documento WO2009/134776; un anticuerpo anti-c-met descrito en el documento WO2010/059654; un anticuerpo anti-c-met descrito en el documento WO2011020925 (incluyendo, pero sin limitarse a un anticuerpo secretado por un hibridoma depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 12 de marzo de 2008 con el número 1-3949 y el hibridoma depositado el 14 de enero de 2010 con el número 1-4273) En algunas realizaciones, el inhibidor de cMET se selecciona a partir del grupo que consiste en K-252a; SU-11274; PHA-665752 y otros inhibidores de cMET descritos en el documento WO 2002/096361; AM7; AMG-208 y otros inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/091374; JNJ-38877605 y otros inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/075567; MK-2461 y otros inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/002254 y/o WO 2007/002258; PF-04217903 y otros inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/132308; BMS 777607; GSK 136089 (también conocido como XL-880 y Foretinib) y otros inhibidores de cMET descritos en el documento WO 2005/030140; BMS 907351 (también conocido como XL-184); EMD 1214063; LY 2801653; ARQ 197; MK 8033; PF 2341066 y otros inhibidores de cMET descritos en el documento WO 2006/021881; MGCD 265; E 7050; MP 470; SGX 523; inhibidores de cMet descritos en Kirin J.J. Cui, Inhibitors targeting hepatocyte growth factor receptor and their potential therapeutic applications. Expert Opin. Ther. Patents 2007; 17: 1035-45; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/103277; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/008310; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/138472; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/008539; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/007390; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/053737; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/024825; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/071451; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/130468; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/051547; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/053157; inhibidores de cMet descritos en los documentos WO 2008/017361; WO 2008/145242; WO2008/145243; WO 2008/148449; WO 2009/007074; WO 2009/006959; WO 2009/024221; WO 2009/030333; y/o WO 2009/083076; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/093049; inhibidores de cMet descritos en el documento US 2008/039457; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/149427; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/050309; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/056692; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/087305; inhibidores de cMet descritos en el documento US 2009/197864; inhibidores de cMet descritos en el documento US 2009/197862; inhibidores de cMet descritos en el documento US 2009/156594; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/124849; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/067119; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/064797; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/045992; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/088881; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/081978; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/079294; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/079291; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/086014; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/033084; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2007/059202; inhibidores de cMet descritos en el documento US 2009/170896; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/077874 y/o WO 2007/023768; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/049855; inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2009/026717; e inhibidores de cMet descritos en el documento WO 2008/046216.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con un agente inmunoterapéutico. La expresión "agente inmunoterapéutico", tal y como se usa en esta memoria, se

refiere a un compuesto, composición o tratamiento que indirecta o directamente mejora, estimula o aumenta la respuesta inmune del organismo contra las células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias contra el cáncer. La inmunoterapia es, por lo tanto, una terapia que estimula o mejora directa o indirectamente las respuestas del sistema inmune frente a las células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes contra el cáncer. La inmunoterapia también se conoce en la técnica como terapia inmunológica, terapia biológica, terapia que modifica la respuesta biológica y bioterapia. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, citocinas, vacunas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y adyuvantes que no son citocinas. Alternativamente, el tratamiento inmunoterapéutico puede consistir en administrar al sujeto una cantidad de células inmunes (linfocitos T, células NK, células dendríticas, linfocitos B...).

Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser inespecíficos, es decir, que estimulan el sistema inmune en general de modo que el cuerpo humano se vuelve más eficaz en la lucha contra el crecimiento y/o la propagación de las células cancerosas, o pueden ser específicos, es decir, dirigidos a las propias células cancerosas. Los regímenes de inmunoterapia se pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos no específicos y específicos.

Los agentes inmunoterapéuticos no específicos son sustancias que estimulan o mejoran indirectamente el sistema inmune. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se han utilizado solos como una terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como en adición a una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico no específico actúa como un adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (por ejemplo, vacunas contra el cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos no específicos también pueden actuar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, una supresión de la médula ósea inducida por ciertos agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos pueden actuar sobre células clave del sistema inmune y causar respuestas secundarias, como una mayor producción de citocinas e inmunoglobulinas. Alternativamente, los propios agentes pueden comprender citocinas. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se clasifican generalmente como citocinas o adyuvantes no citocinas.

Diversas citocinas han encontrado una aplicación en el tratamiento del cáncer como inmunoterapias generales no específicas, diseñadas para estimular el sistema inmune o como adyuvantes proporcionados con otras terapias. Las citocinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, interferones, interleucinas y factores estimuladores de colonias. Los interferones (IFNs) contemplados por la presente descripción incluyen los tipos comunes de IFNs, IFN-alfa (IFN- α), IFN-beta (IFN- β) e IFN-gamma (IFN- γ). Los IFNs pueden actuar directamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando su crecimiento, promoviendo su desarrollo en células con un comportamiento más normal y/o aumentando su producción de antígenos, haciendo de ese modo que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir con el sistema inmune. Los IFNs también pueden actuar indirectamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando la angiogénesis, estimulando el sistema inmune y/o estimulando las células citotóxicas naturales (NK), los linfocitos T y los macrófagos. El IFN-alfa recombinante está disponible comercialmente como Roferon (Roche Pharmaceuticals) e Intron A (Schering Corporation). Las interleucinas contempladas por la presente descripción incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles comercialmente incluyen Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Washington) está sometiendo a ensayo actualmente una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para uso en las combinaciones de la presente descripción. Los factores estimulantes de colonias (CSFs) contemplados por la presente descripción incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y la eritropoyetina (epoyetina alfa, darbepoyetina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en sujetos sometidos a una quimioterapia tradicional. En consecuencia, el tratamiento con CSFs puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y puede permitir el uso de dosis más altas de agentes quimioterapéuticos. Diversos factores estimulantes de colonias recombinantes están disponibles comercialmente, por ejemplo, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoyetina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoyetina; Amgen), Arnesp (eritropoyetina).

Las composiciones combinadas y los métodos de administración combinados de la presente descripción también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "células completas" y "adoptivos". Por ejemplo, esos métodos pueden comprender una infusión o reinfusión de células del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos que infiltran tumores (TILs), tales como los linfocitos T CC2+ y/o CD8+ (por ejemplo, linfocitos T expandidos con antígenos específicos de tumores y/o mejoras genéticas), linfocitos B que expresan anticuerpos u otras células productoras o presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (p. ej., células dendríticas cultivadas con un agente de expansión de CDs tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas asociadas a tumores cargadas de antígeno), células NK antitumorales, denominadas células híbridas o combinaciones de las mismas. Los lisados celulares también pueden ser útiles en esos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en tales aspectos incluyen Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) y lisados celulares de Melacine®. Los antígenos que se desprenden de las células cancerosas y sus mezclas (véase, por ejemplo, Bystryn et al., Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, julio de 2001), opcionalmente mezclados por adición con adyuvantes como el alumbre, también pueden ser componentes en tales métodos y composiciones combinadas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se usa en combinación con

una radioterapia. Una radioterapia puede comprender una radiación o una administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna para el paciente que está siendo tratado (el tratamiento con radiación puede ser, por ejemplo, en forma de una radioterapia con haces externos (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que se pueden emplear en la puesta en práctica de tales métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yoduro-123, yoduro-131 e indio-111.

Para la administración, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de modo que 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. Una 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 (compilador), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19ª ed. 1995)). Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc.

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

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

Normalmente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Esta puede ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, del agua esterilizada o la solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar como una función de varios parámetros, y en particular como una función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.

Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede disolver o dispersar en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una capacidad de inyección fácil. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y debe estar protegida contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

Las soluciones de los compuestos activos como una 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. En condiciones normales de almacenamiento y uso, esas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Un anticuerpo monoclonal humano de la presente descripción se puede formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o un 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 adecuada se puede conservar, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede producir 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 de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de 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 enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

También se contempla la preparación de más soluciones o de soluciones altamente concentradas para una inyección directa, en donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, entregando concentraciones elevadas de los agentes activos en un área tumoral pequeña.

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

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se debe volver isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que se pueden emplear de cara a la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirla a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarla en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación tendrá lugar necesariamente, dependiendo del estado del sujeto que se va a tratar. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente descripción se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para que comprendan 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 aproximadamente. También se pueden administrar dosis múltiples.

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

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

Las nanocápsulas generalmente pueden encerrar compuestos de manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a una sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) generalmente se diseñan utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen esos requisitos, se contemplan para uso en la presente descripción, y esas partículas se pueden preparar fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas concéntricas multilamelares con una bicapa (también llamadas vesículas multilamelares (MLVs)). Las MLVs generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . Someter las MLVs a ultrasonidos da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el centro. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes Figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y Figuras no se deben interpretar de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

50 Figuras

Figura 1: Efecto de OxB y anticuerpos anti-Ox1R que incluyen B4, B10, C1, C2, D4, E7, H7 sobre el crecimiento celular de las células HEK-OX1R que expresan OX1R recombinante. Las células se trataron durante 48 h con 0,1 μM de cada compuesto y luego se contaron las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje del número de células no tratadas (Control).

55 Figura 2: Efecto de OxB y anticuerpos anti-OX1R, que incluyen B4, B10, C1, C2, D4, E7, H7 sobre el crecimiento

celular de las células HEK que no expresan OX1R. Las células se trataron durante 48 h con 0,1 μM de cada compuesto y luego se contaron las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje del número de células no tratadas (Control).

5 Figura 3: Efecto de OxB y anticuerpos anti-OX1R que incluyen B4, B10, C1, C2, D4, E7, H7 sobre el crecimiento celular de HEK-OX1R en presencia de NSC87877. El inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa SHP-2, NSC-87877, bloquea la apoptosis inducida por orexina. Las células se trataron durante 48 h con 0,1 μM de cada compuesto y luego se contaron las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje del número de células no tratadas (Control).

10 Figura 4: Efecto de OxB, OxA y anticuerpos anti-OX1R, que incluyen C1, C2, B6, H7, sobre el crecimiento celular de HEK-mouseOX1R (izquierda) y CHO-ratOX1R. Las células se trataron durante 48 h con 0,1 μM de cada compuesto y luego se contaron las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje del número de células no tratadas (Control).

15 Figura 5: Efecto de OxB y anticuerpos anti-OX1R que incluyen B4, B10, C1, C2, D4, E7, H7 sobre el crecimiento celular de las líneas de células de cáncer de colon SW48 (arriba a la izquierda) y LoVo (arriba a la derecha) que expresaban OX1R; la línea celular de cáncer de colon HCT-116 (abajo a la derecha) que no expresaba OX1R; y la línea celular de cáncer de páncreas AsPC-1 (abajo a la izquierda) que expresaba OX1R. Las células se trataron durante 48 h con 0,1 μM de cada compuesto y luego se contaron las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje del número de células no tratadas (Control).

20 Figura 6: Efecto de OxB y anticuerpos anti-OX1R que incluyen B4, B6, B10, C1, C2, E7 y H7 sobre la apoptosis en células HEK-OX1R que expresan OX1R recombinante. El inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa SHP-2, NSC-87877, bloquea la apoptosis inducida por orexina. Las células HEK-OX1R se estimularon con 0,1 μM de cada compuesto durante 48 horas en ausencia (barras negras) o en presencia (barras blancas) de NSC-87877 (50 μM). La apoptosis se midió mediante una determinación de la unión de anexina V-PE, y los resultados se expresan como el porcentaje de células apoptóticas.

25 Figura 7: Inhibición competitiva de la unión específica de ^{125}I -OxA a células HEK-OX1R aumentando las concentraciones de OxB no marcado, Cetuximab (anticuerpo irrelevante) y anticuerpos anti-OX1R, que incluyen B6, C1 y C2. Las células se incubaron con la concentración indicada de OxB (\bullet), Cetuximab (\blacktriangle), B6 (\blacksquare), C1 (\circ) y C2 (\triangle). Los resultados se expresaron como el porcentaje de radiactividad unida específicamente en ausencia de un compuesto no marcado añadido. Cada punto es la media de tres experimentos distintos. ND, no determinado.

30 Figura 8: Efecto de la inoculación de orexina-A y anticuerpo C2 sobre el crecimiento de tumores desarrollados por células HT-29 humanas xenotransplantadas en ratones sin pelo. Las células obtenidas a partir de un adenocarcinoma de colon, HT-29, se inocularon en el costado de ratones sin pelo el día 0. A los ratones se les inyectó intraperitonealmente el día 1 (2 inyecciones/semana) 100 μl de solución de orexina-A (1,4 μmoles de orexina-A/kg (círculos blancos)) o 100 μl de solución de anticuerpo C2 (0,065 μmoles /kg (triángulos negros) o 0,02 μmoles /kg (triángulos blancos)) o 100 μl de PBS (círculos negros) para el control.

Ejemplos

Ejemplo 1:

El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra OX1R se produjo mediante una estrategia de presentación en fagos y la selección de anticuerpos se realizó usando líneas celulares HEK y HEK que expresaban OX1R de forma estable (HEK-OX1R). Como una primera etapa, se analizó un lote de 7 anticuerpos diferentes, denominados B4, B10, C1, C2, D4, E7 y H7 para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento celular de HEK-OX1R. Las células se incubaron con 0,1 μM de OxB o anticuerpos durante 48 h en medio de cultivo y luego se contaron las células con el fin de estimar el crecimiento celular. Como se muestra en la Figura 1, C1 y C2 reducían el número de células HEK-OX1R en aproximadamente un 46% \pm 3 y 37 \pm 3% respectivamente, en comparación con la orexina-B (OxB, 0,1 μM) que reducía un 40 \pm 3% el número de células (Figura 1). En contraste, B4, B10, D4, E7 y H7 tienen un efecto débil sobre el crecimiento celular (intervalo de 14% a 20%) en comparación con OxB (Figura 1). Para determinar la especificidad de la inhibición del crecimiento celular inducida por estos anticuerpos, esta se sometió a ensayo en células HEK que no expresaban OX1R. Como se muestra en la Figura 2, ningún anticuerpo anti-OX1R inducía una inhibición del crecimiento celular, lo que demuestra que los efectos observados de C1, C2 y en menor medida de B4, B10, D4, E7 y H7 sobre el crecimiento celular de HEK-OX1R, estaban claramente asociados con la presencia de OX1R. Como se ha descrito anteriormente, las orexinas (A y B) inducían una apoptosis mitocondrial mediada por un mecanismo completamente novedoso, no relacionado con la activación de la fosfolipasa C mediada por Gq. De hecho, las orexinas inducían la fosforilación de tirosina de dos motivos inhibidores basados en tirosina de inmunorreceptores (ITIMs) ubicados en la secuencia de OX1R. El receptor fosforilado resultante podía reclutar y activar la fosfotirosina fosfatasa, SHP-2, que es responsable de la apoptosis mitocondrial, implicando la liberación de citocromo c desde las mitocondrias al citosol y la activación de caspasa-3 y caspasa-7. En este caso, sometimos a ensayo el efecto del inhibidor SHP (NSC 87877) sobre la capacidad de anti-OX1R para inhibir el crecimiento celular de HEK-OX1R (Figura 3). Las células HEK-OX1R se incubaron 48 h con 0,1 μM de OxB o anticuerpos en presencia

de NSC 87877 50 μM . Como se muestra en la Figura 3, la inhibición del crecimiento celular inducida por OxB (Figura 1) se revertía totalmente en presencia de inhibidor SHP, en comparación con las células no tratadas, lo que indicaba que el efecto de la orexina estaba bien relacionado con el reclutamiento de SHP2. De manera similar, la inhibición del crecimiento celular inducida por C1 y C2, pero también por otros anticuerpos (B4, B10, D4, E7 y H7), se revertía totalmente con NSC 87877. Estos resultados demuestran que la inhibición del crecimiento celular mediada por C1 y C2 estaba asociada con la vía de señalización de SHP2 como se ha descrito previamente para las orexinas/OX1R. Finalmente, mostramos que los anticuerpos son capaces de reaccionar de forma cruzada entre especies (humanos, ratas y ratones), ya que los anticuerpos C1 y C2 pueden favorecer la apoptosis de líneas celulares CHO transfectadas con OX1R de ratón o de rata (Figura 4).

Se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos para inhibir el crecimiento celular en líneas celulares de cáncer obtenidas a partir de cáncer de colon (células SW48, LoVo y HCT-116) y cáncer de páncreas (células AsPC-1). Los datos revelan que: 1) C1, C2 y también B4 inhiben el crecimiento celular en las células SW48 de manera similar a OxB (Figura 5). D4 y H7 tienen un efecto débil. En contraste, B10 y E7 no tienen ningún efecto sobre el crecimiento celular (Figura 5). Además, todos los efectos observados inducidos por los anticuerpos se revertían totalmente en presencia del inhibidor NSC 87877 (no se muestra); 2) C1 y C2 inhiben el crecimiento celular en las células LoVo de manera similar a OxB (Figura 5). Inversamente, B4, B10, D4, E7 y H7 no tienen ningún efecto o tienen un efecto débil sobre el crecimiento celular; 3) todos los anticuerpos excepto B10 y E7 inhiben el crecimiento celular en las células AsPC-1 obtenidas a partir de cáncer de páncreas. Cabe señalar que C1, C2 y B4 muestran una inhibición del crecimiento celular similar al efecto de OxB (Figura 5); 4) todos los anticuerpos no tienen ningún efecto sobre el crecimiento celular de las células HCT-116 (Figura 5) las cuales no expresan OX1R, lo que confirma que en ausencia del receptor de la orexina, los anticuerpos no tienen ningún efecto sobre el crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer. Como se ha descrito anteriormente (véase más arriba), las orexinas son capaces de inducir una apoptosis mitocondrial en las líneas celulares de cáncer. Se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos para inducir una apoptosis en las células HEK-OX1R y la línea celular de cáncer de colon LoVo. Las células se incubaron durante 48 h en presencia de OxB 0,1 μM o 0,1 μM de cada anticuerpo y luego se determinó la apoptosis usando el sistema PCA de Guava y el kit de nexina de Guava. La Figura 6 muestra que C1 y C2 son capaces de inducir la apoptosis en las células HEK-OX1R, respectivamente, $12 \pm 1\%$ y $16 \pm 2\%$ del total de células, en comparación con OxB, $37 \pm 2\%$. Este efecto era dependiente de la dosis. De hecho, cuando las células HEK-OX1R se trataban con 0,01 μM de anticuerpo C2, la apoptosis celular era solo en un $6 \pm 0,7\%$ del total de células. En contraste, B4, E7 y H7 no tienen ningún efecto sobre la apoptosis celular. Cabe señalar que el anticuerpo B10 tiene un efecto débil sobre la inducción de la apoptosis, pero es independiente de las dosis, lo que sugiere una respuesta no específica. Del mismo modo, el anticuerpo C2 (0,1 μM) era capaz de inducir apoptosis en la línea celular de cáncer LoVo. Este efecto apoptótico era dependiente de la dosis ya que el tratamiento de LoVo con 0,01 μM de C2 reduce fuertemente la respuesta apoptótica. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que C2 y C1 pueden 1) inducir una fuerte inhibición del crecimiento celular y; 2) estimular la apoptosis en HEK-OX1R y líneas celulares de cáncer. Estas propiedades son específicas, ya que en ausencia de una expresión de OX1R (células HEK y HCT-116) o en presencia del inhibidor de SHP (NSC 87877), estos efectos están totalmente anulados.

La capacidad de los anticuerpos C1 y C2 para interactuar con el sitio de unión de OX1R se determinó mediante inhibición competitiva del estudio de unión de ^{125}I -OxA. Las células HEK-OX1R se incubaron con ^{125}I -OxA en presencia de una concentración creciente de anticuerpos de OxB, C1 o C2 naturales y se midió la unión específica resultante de ^{125}I -OxA. Como se muestra en la Figura 8, los anticuerpos C1 y C2 eran capaces de inhibir competitivamente la unión de ^{125}I -OxA a HEK-OX1R con una CI_{50} estimada de aproximadamente 5 μM , en comparación con OxB ($\text{CI}_{50} = 10 \text{ nM}$). Estos resultados indican que los anticuerpos C1 y C2 desplazan específicamente la unión de OxA con su receptor OX1R.

Ejemplo 2:

Los inventores han sometido a ensayo la capacidad del anticuerpo C2 para inhibir el desarrollo tumoral de ratones sin pelo xenoinjertados con la línea celular de adenocarcinoma de colon humano, HT-29. Después de una inyección subcutánea de $1,5 \times 10^6$ células HT-29 en los ratones, los animales fueron tratados con 2 inyecciones intraperitoneales (ip)/semana de Orexina-A (100 μg /inyección correspondiente a 1,4 μmoles de orexina-A/kg) o dos dosis de anticuerpo C2 (200 μg /inyección o 50 μg /inyección correspondiente a 0,065 $\mu\text{moles/kg}$ y 0,02 $\mu\text{moles/kg}$, respectivamente). El control se determinó mediante una inyección ip de 100 μl de PBS. El experimento se realizó durante 45 días y el volumen tumoral se estimó midiendo cada 2/3 días los ejes cortos y largos de los tumores desarrollados. Como se muestra en la Figura 8, los inventores observaron que las células HT-29 inducían un volumen tumoral de aproximadamente $1600 \pm 120 \text{ mm}^3$ (Día 43) en ausencia de tratamiento (círculos negros). En contraste, una inyección de anticuerpo C2 (triángulo negro) reducía fuertemente el desarrollo tumoral en aproximadamente un 60% (volumen tumoral # $650 \pm 98 \text{ mm}^3$) en comparación con el tratamiento con orexina que inducía una inhibición de aproximadamente el 65% (volumen tumoral # $570 \pm 100 \text{ mm}^3$). Cabe señalar que el uso de dosis bajas de anticuerpo C2 (triángulos blancos) inducía la menor inhibición del crecimiento tumoral de un 45% (volumen tumoral # $885 \pm 130 \text{ mm}^3$), revelando una relación dosis respuesta.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Lista de secuencias

- <110> Insepm
- 5 <120> Anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor de la orexina de tipo 1
- <130> BIO14372 COUVINEAU / MC
- <160> 2
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 120
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> secuencia VH de C2
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Ser | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asn | Ser |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Ser | Ile | Tyr | Gly | Ser | Ser | Arg | Tyr | Ile | Asp | Tyr | Ala | Asp | Phe | Val |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Thr | Asn | Ser | Leu | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Arg | Ser | Ser | Ser | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Gly | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Arg |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | | | |
- <210> 2
- 25 <211> 111
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223> secuencia VL de C2
- <400> 2

ES 2 743 950 T3

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

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

Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly
 100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano contra OX1R que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de C2, ii) la H-CDR2 de C2 y iii) la H-CDR3 de C2 y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de C2, ii) la L-CDR2 de C2 y iii) la L-CDR3 de C2, en donde
- 5 - la H-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 31 hasta el residuo de aminoácido en la posición 35 en SEQ ID NO: 1,
- la H-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 50 hasta el residuo de aminoácido en la posición 66 en SEQ ID NO: 1,
- 10 - la H-CDR3 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 99 hasta el residuo de aminoácido en la posición 109 en SEQ ID NO: 1,
- la L-CDR1 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 23 hasta el residuo de aminoácido en la posición 36 en la SEQ ID NO: 2,
- la L-CDR2 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 52 hasta el residuo de aminoácido en la posición 58 en SEQ ID NO: 2, y
- 15 - la L-CDR3 de C2 se define por la secuencia que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición 91 hasta el residuo de aminoácido en la posición 100 en SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, que es un anticuerpo que comprende una cadena pesada idéntica a SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera idéntica a SEQ ID NO: 2.
3. Un fragmento del anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, que se selecciona a partir del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
- 20 4. Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo humano según la reivindicación 1.
5. Un vector que comprende una molécula nucleica según la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4 o el vector según la reivindicación 5.
- 25 7. El anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, para uso como medicamento.
8. El anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo requiere.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1.
- 30

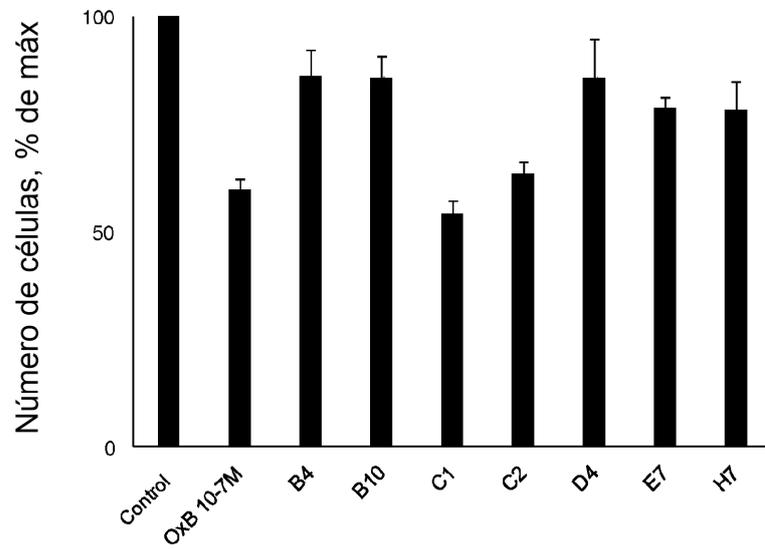


Figura 1

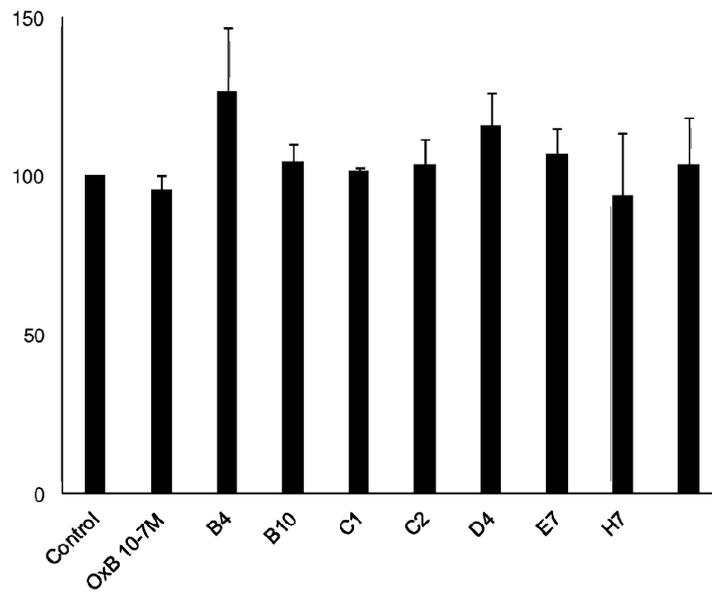


Figura 2

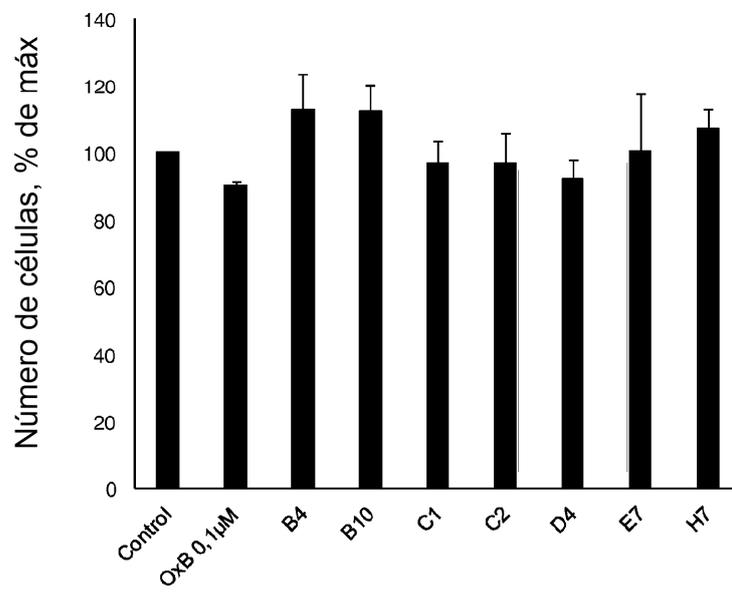


Figura 3

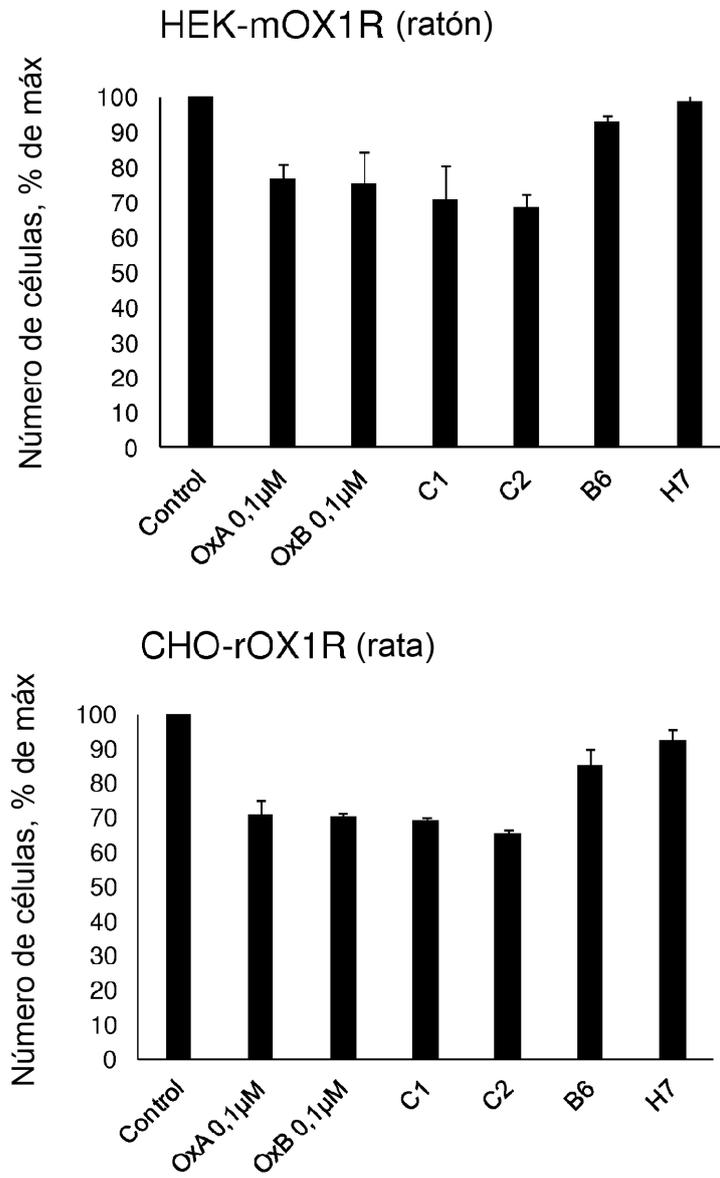


Figura 4

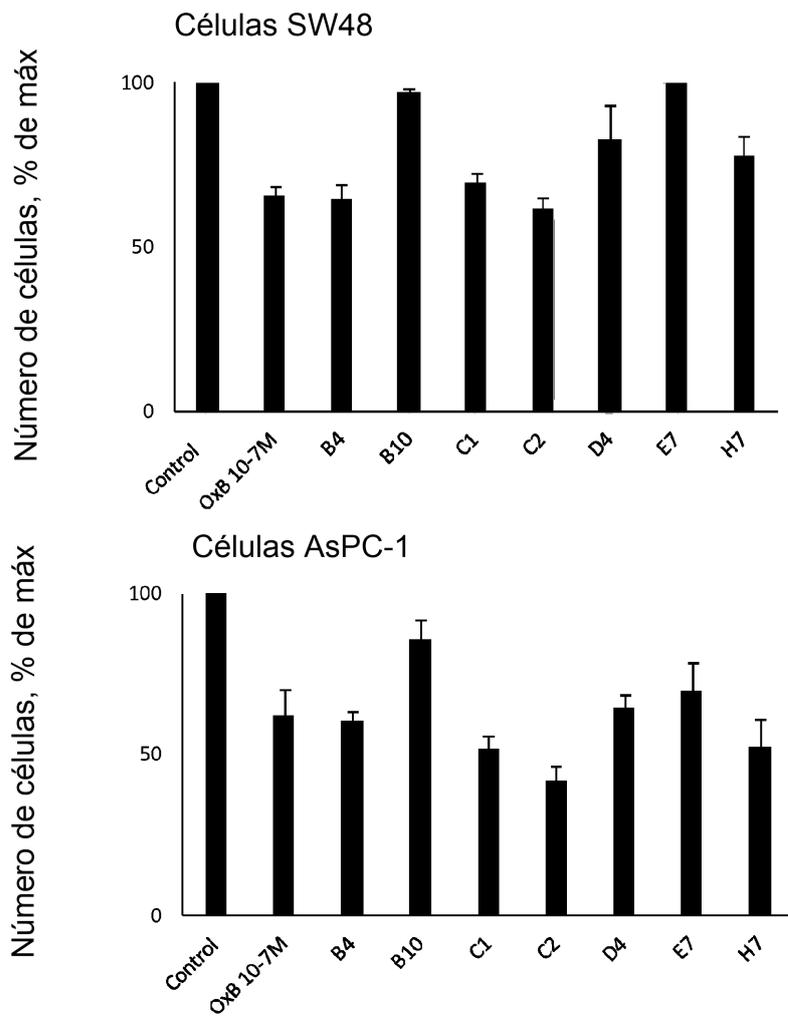


Figura 5A

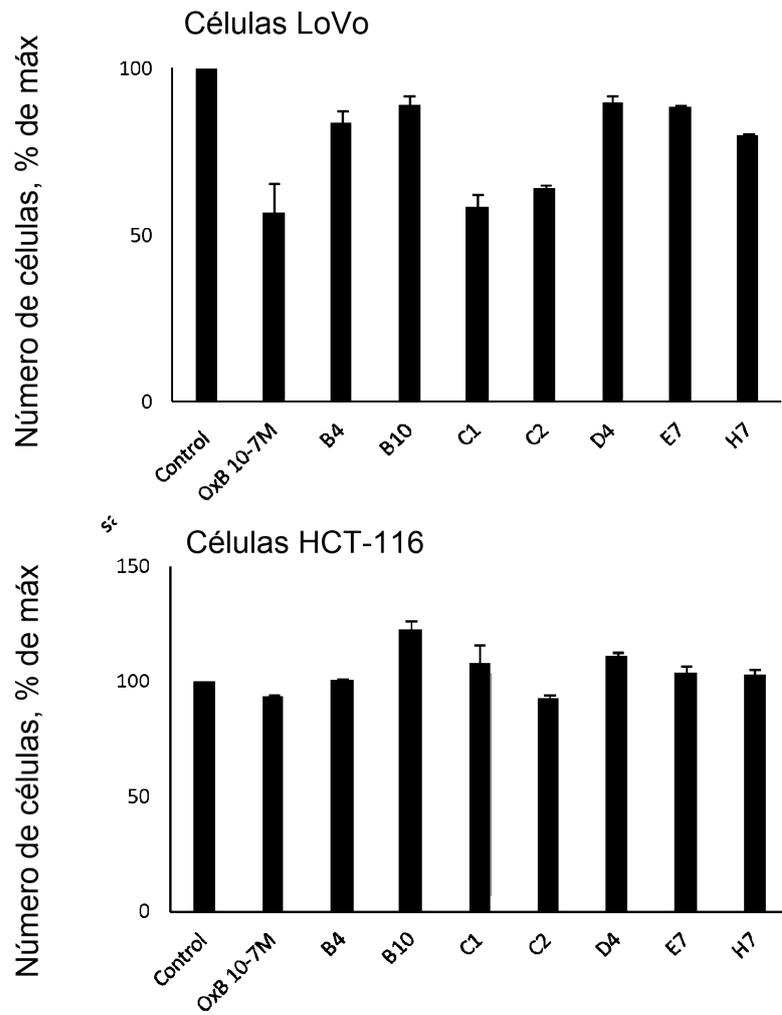


Figura 5B

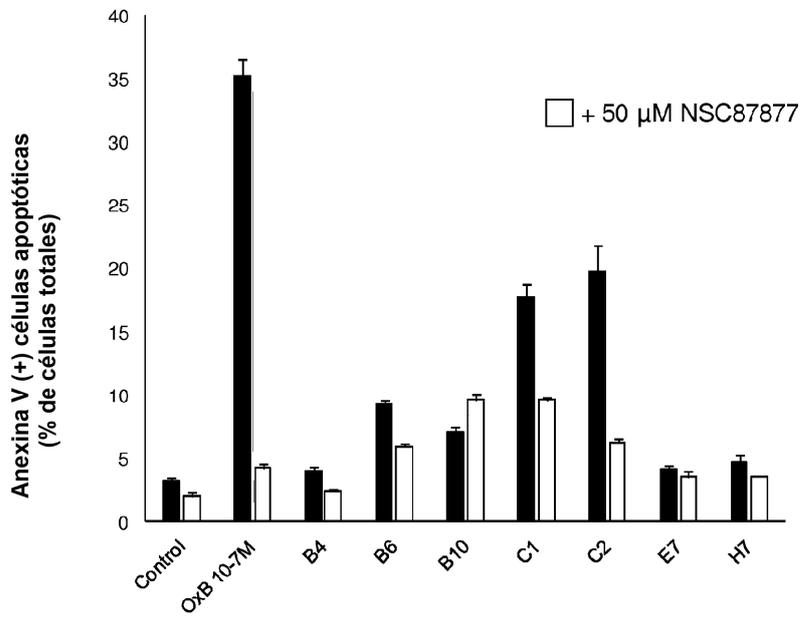


Figura 6

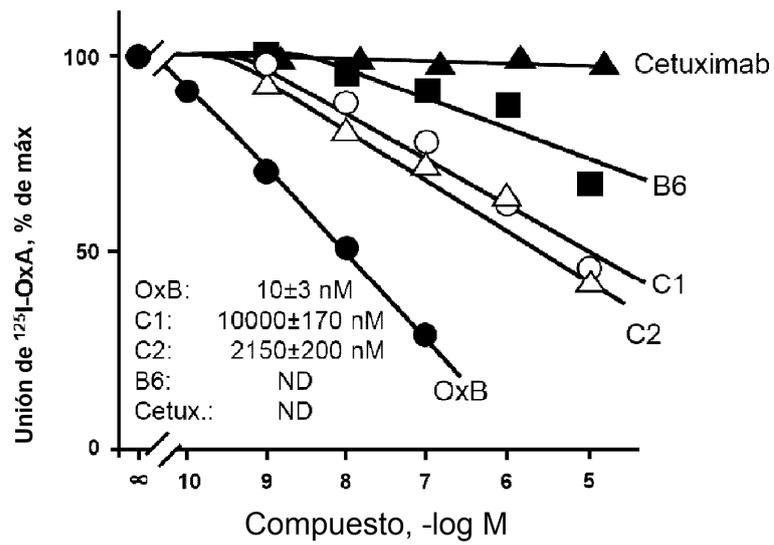


Figura 7

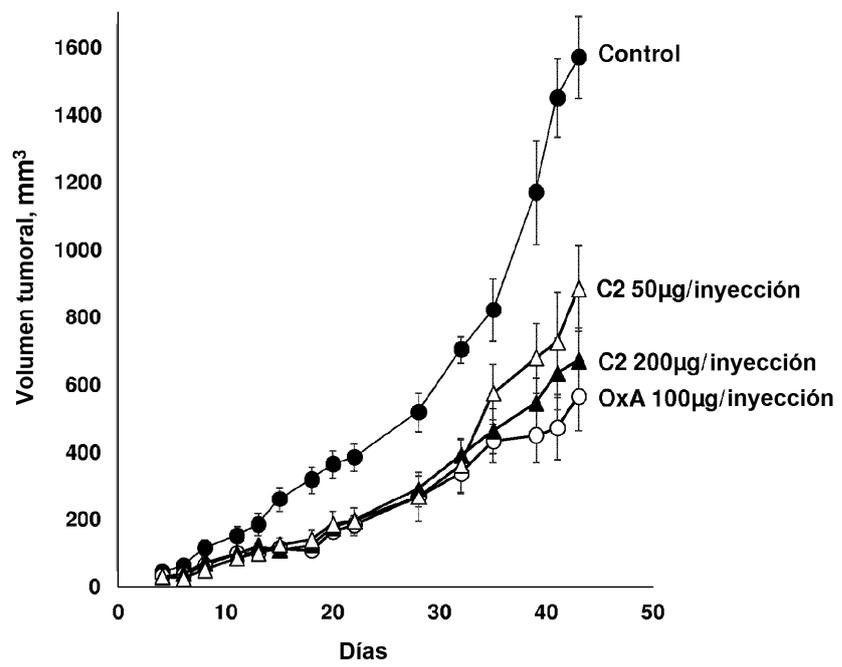


Figura 8