

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 299**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2015 PCT/EP2015/079003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16091891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2015 E 15805233 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3229836**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra AXL**

30 Prioridad:

**09.12.2014 EP 14306982**

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

**02.06.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y  
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROBERT, BRUNO;  
LARBOURET, CHRISTEL;  
MARTINEAU, PIERRE y  
POUL, MARIE-ALIX**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 764 299 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 AXL

### 5 Sector de la técnica

En el presente documento se desvelan anticuerpos monoclonales humanos contra AXL y el uso de los mismos para el tratamiento del cáncer.

### 10 Estado de la técnica

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

La desregulación de AXL o su ligando Gas6 está implicada en la patogénesis de una variedad de cánceres humanos. Se ha informado de la sobreexpresión de AXL en una amplia gama de cánceres humanos (pulmón, próstata, mama, gástrico, pancreático, ovario, tiroides, cánceres de sangre, carcinoma de células renales así como glioblastoma...) y se asocia con invasividad, metástasis y pronóstico negativo. Estos hallazgos sugieren que AXL puede estar implicado en la regulación de múltiples aspectos de la tumorigénesis, incluido el crecimiento tumoral, la invasión y la angiogénesis y, por lo tanto, representa un objetivo para la intervención terapéutica en el cáncer, especialmente para el desarrollo de la terapia antimetastásica contra el cáncer y para otros múltiples tratamientos contra el cáncer que incluyen tratamiento de resistencia a fármacos. Recientemente, AXL se ha descrito como un agente importante en la resistencia tumoral a Erlotinib en pacientes. De hecho, la sobreexpresión de AXL se detecta en tumores de pacientes resistentes a Erlotinib e, *in vitro*, se puede restaurar la sensibilidad mediante la atenuación génica del receptor AXL en líneas celulares tumorales resistentes a Erlotinib establecidas a partir del paciente (Zhang Z et al. Nat Genetics, 2012). La observación de que AXL juega un papel clave en los tumores que han desarrollado una resistencia a TKI también se ha observado en otras patologías del cáncer como CML resistente a Nilotinib o Imatinib (Gioia R et al Blood 2011; Dufies M et al. Oncotarget 2011) y GIST que se vuelve resistente a Imatinib (Mahodevan D et al Oncogene 2007). Curiosamente, un artículo reciente describió también que la expresión del receptor AXL se correlaciona con la resistencia antiCetuximab de EGFR (Brand TM et al. Cancer Res 2014). Además, ahora está bien descrito que el receptor AXL y el EGFR se heterodimerizan en la membrana de la superficie de la célula tumoral (Meyer AS et al, Sci Signal 2013; Heideman MR et al., BCR 2013) y que la fosforilación del dominio intracelular de AXL puede sustituir al de EGFR cuando las células tumorales se tratan con inhibidores de tirosina cinasa contra EGFR o HER2.

Por consiguiente, se han descrito anticuerpos monoclonales anti-AXL para su uso en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, las publicaciones relacionadas con los anticuerpos anti-AXL incluyen los documentos WO2009/063965, WO2009/062690, WO2011/014457, WO2011/159980 y WO2012/175692.

### 50 Objeto de la invención

En el presente documento se desvelan anticuerpos monoclonales y conjugados anticuerpo-fármaco contra AXL y su uso para el tratamiento del cáncer, incluidos otros aspectos relacionados definidos mediante las reivindicaciones.

### 55 Descripción detallada de la invención

En el presente documento se desvelan anticuerpos monoclonales humanos y conjugados anticuerpo-fármaco contra AXL. En particular, los anticuerpos de la presente divulgación se caracterizan por una o más propiedades funcionales tales que son anticuerpos completamente humanos, se unen con alta afinidad al AXL humano, son capaces de reaccionar de forma cruzada entre la forma murina y humana del AXL, inducen la internalización y degradación del receptor, son capaces de favorecer la homodimerización del receptor, inhiben la fosforilación de AXL, inhiben la proliferación celular *in vitro*, restauran la sensibilidad a Nilotinib de células CML resistentes que sobreexpresan AXL y células GIST resistentes a Imatinib, y disminuyen el crecimiento tumoral *in vivo*. En particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos que proceden del anticuerpo D4 como se describe en el EJEMPLO.

El término "realización" tal como se usa en el presente documento significa un aspecto particular de la divulgación, y no se usa para indicar aspectos de la invención reivindicada, que se define exclusivamente en las reivindicaciones.

El término "AXL" tiene su significado general en la técnica y se refiere al AXL humano. AXL también se conoce como "Ark", "Tyro-7", "UFO" o "JTK11".

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tiene el mismo significado, y se usará igualmente en la presente divulgación. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, 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 une inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (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, de sus siglas en inglés) y un dominio constante (CL, de sus siglas en inglés). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH, de sus siglas en inglés) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH, de sus siglas en inglés). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL, de sus siglas en inglés) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como asociación de cadena de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria, unión de complemento y unión a receptores Fc (FcR, de sus siglas en inglés). 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 restos que provienen principalmente de las regiones determinantes de hipervariabilidad o complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés). Ocasionalmente, los restos de regiones no hipervariables o marco (FR, de sus siglas en inglés) 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 CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y la especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina natural. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR procedente de cada región V de cadena pesada y ligera. Las regiones marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR. Los restos en dominios variables de anticuerpos están numerados convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se expone en Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Estados Unidos (en adelante "Kabat et al."). Este sistema de numeración se utiliza en la presente especificación. Las designaciones de restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos en las secuencias de 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 de, o inserción en, un componente estructural, ya sea región marco o región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica de dominio variable. La numeración de Kabat correcta de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional". Las CDR del dominio variable de cadena pesada se ubican en los restos 31-35B (H-CDR1), los restos 50-65 (H-CDR2) y los restos 95-102 (H-CDR3) de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Las CDR del dominio variable de cadena ligera se ubican en los restos 24-34 (L-CDR1), los restos 50-56 (L-CDR2) y los restos 89-97 (L-CDR3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria y específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "Ac monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "AcM", o similares, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítipo concreto. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

ES 2 764 299 T3

De acuerdo con la divulgación, la región VH del anticuerpo D4 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 que se define como sigue y la secuencia numerada de Kabat se define en la Tabla A.

SEQ ID NO:1

EVQLVESGGSLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGLEWISSIG  
SSRYIYYADFKGRFTISRDNATNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGRKDSGTI  
YHWGRGTLVTVSS

5

**TABLA A: secuencia numerada de Kabat del dominio VH de D4**

Posición en la 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
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	<b>H31</b>	N
32	<b>H32</b>	Y
33	<b>H33</b>	S
34	<b>H34</b>	M
35	<b>H35</b>	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

ES 2 764 299 T3

(continuación)

Posición en la SEQ ID NO: 1	Numeración de Kabat	Aminoácido
47	H47	W
48	H48	I
49	H49	S
50	<b>H50</b>	S
51	<b>H51</b>	I
52	<b>H52</b>	S
53	<b>H52A</b>	G
54	<b>H53</b>	S
55	<b>H54</b>	S
56	<b>H55</b>	R
57	<b>H56</b>	Y
58	<b>H57</b>	I
59	<b>H58</b>	Y
60	<b>H59</b>	Y
61	<b>H60</b>	A
62	<b>H61</b>	D
63	<b>H62</b>	F
64	<b>H63</b>	V
65	<b>H64</b>	K
66	<b>H65</b>	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
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	<b>H95</b>	G
100	<b>H96</b>	R
101	<b>H97</b>	K
102	<b>H98</b>	D
103	<b>H99</b>	S
104	<b>H100</b>	G
105	<b>H100A</b>	T
106	<b>H100B</b>	I
107	<b>H101</b>	Y

(continuación)

Posición en la SEQ ID NO: 1	Numeración de Kabat	Aminoácido
108	<b>H102</b>	H
109	H103	W
110	H104	G
111	H105	R
112	H106	G
113	H107	T
114	H108	L
115	H109	V
116	H110	T
117	H111	V
118	H112	S
119	H113	S

Por consiguiente, la H-CDR1 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 31 hasta el resto de aminoácido en la posición 35 en la SEQ ID NO: 1.

- 5 Por consiguiente, la H-CDR2 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 50 hasta el resto de aminoácido en la posición 66 en la SEQ ID NO: 1.

Por consiguiente, la H-CDR3 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 99 hasta el resto de aminoácido en la posición 108 en la SEQ ID NO: 1.

- 10 De acuerdo con la divulgación, la región VL del anticuerpo D4 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2 que se define como sigue y la secuencia numerada de Kabat se define en la Tabla B.

SEQ ID NO:2:

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYED  
 SKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCKKDDYSLRFTFGGGTK  
 LAVLG

15

**TABLA B: secuencia numerada de Kabat del dominio VL de D4**

Posición en la 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
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	<b>L24</b>	A
24	<b>L25</b>	G

ES 2 764 299 T3

(continuación)

Posición en la SEQ ID NO: 2	Numeración de Kabat	Aminoácido
25	<b>L26</b>	T
26	<b>L27</b>	S
27	<b>L27A</b>	S
28	<b>L27B</b>	D
29	<b>L27C</b>	V
30	<b>L28</b>	G
31	<b>L29</b>	G
32	<b>L30</b>	Y
33	<b>L31</b>	N
34	<b>L32</b>	Y
35	<b>L33</b>	V
36	<b>L34</b>	S
37	L35	W
38	L36	Y
39	L37	Q
40	L38	Q
41	L39	H
42	L40	P
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	<b>L50</b>	E
53	<b>L51</b>	D
54	<b>L52</b>	S
55	<b>L53</b>	K
56	<b>L54</b>	R
57	<b>L55</b>	P
58	<b>L56</b>	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
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

(continuación)

Posición en la SEQ ID NO: 2	Numeración de Kabat	Aminoácido
86	L84	A
87	L85	D
88	L86	Y
89	L87	Y
90	L88	C
91	<b>L89</b>	K
92	<b>L90</b>	K
93	<b>L91</b>	D
94	<b>L92</b>	D
95	<b>L93</b>	Y
96	<b>L94</b>	S
97	<b>L95</b>	L
98	<b>L95A</b>	R
99	<b>L96</b>	F
100	L97	T
101	L98	F
102	L99	G
103	L10	G
104	L101	G
105	L102	T
106	L103	K
107	L104	L
108	L105	A
109	L10	V
110	L106A	L
111	L107	G

Por consiguiente, la L-CDR1 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 23 hasta el resto de aminoácido en la posición 36 en la SEQ ID NO: 2.

- 5 Por consiguiente, la L-CDR2 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 52 hasta el resto de aminoácido en la posición 58 en la SEQ ID NO: 2.

Por consiguiente, la L-CDR3 de D4 se define mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 91 hasta el resto de aminoácido en la posición 100 en la SEQ ID NO: 2.

- 10 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDR de D4. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo monoclonal humano de la divulgación todavía permite que el anticuerpo retenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original (es decir, el anticuerpo D4) y, en algunos casos, dicho anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el Ac original. Dichas variantes funcionales retienen normalmente una identidad de secuencia significativa con el Ac original. La secuencia de variantes de 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 un 35 %, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, (por ejemplo, aproximadamente un 65-95 %, tal como aproximadamente un 92 %, 93 % o 94 %) de las sustituciones en la variante son reemplazos conservadores de restos de aminoácidos. Las secuencias de variantes de CDR pueden diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias de 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 reemplazos conservadores de restos de aminoácidos. En el contexto de la presente divulgación, las sustituciones conservadoras pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas como sigue:

- 30 Restos alifáticos I, L, V y M  
 Restos asociados a cicloalqueno F, H, W e Y  
 Restos hidrófobos A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y  
 Restos cargados negativamente D y E  
 Restos polares C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T  
 35 Restos cargados positivamente H, K y R  
 Restos pequeños A, C, D, G, N, P, S, T y V

Restos muy pequeños A, G y S

Restos implicados en el turno A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y la formación T

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

- 5 Los grupos de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. La conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y peso/tamaño del resto también se retiene sustancialmente en una variante de CDR en comparación con una CDR de D4. 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, 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 sus características de hidrofobicidad y carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). La retención de restos similares también se puede medir o, alternativamente, mediante una puntuación de similitud, según se determina mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI usando configuraciones estándar BLOSUM62, Hueco abierto = 11 y Hueco extendido = 1). Las variantes adecuadas exhiben normalmente al menos aproximadamente un 70 % de identidad con el péptido original. De acuerdo con la divulgación, 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.
- 10
- 15
- 20
- 25 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR1 de D4, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR2 de D4 y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR3 de D4.
- 30 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR1 de D4, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR2 de D4 y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR3 de D4.
- 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR1 de D4, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR2 de D4 y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 90 % de identidad con la H-CDR3 de D4 y una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR1 de D4, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR2 de D4 y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 90 % de identidad con la L-CDR3 de D4.
- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de D4, ii) la H-CDR2 de D4 y iii) la H-CDR3 de D4.
- 45 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de D4, ii) la L-CDR2 de D4 y iii) la L-CDR3 de D4.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de D4, ii) la H-CDR2 de D4 y iii) la H-CDR3 de D4 y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de D4, ii) la L-CDR2 de D4 y iii) la L-CDR3 de D4.
- 50 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1
- 55 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.
- 60 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que es idéntica a la SEQ ID NO: 1
- 65 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que es idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende una cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera idéntica a la SEQ ID NO: 2.

- 5 El anticuerpo de la divulgación puede caracterizarse 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.

10 El anticuerpo de la divulgación puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente se guiará por las funciones efectoras deseadas, tal como la inducción de ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda, se pueden usar. Si se desea, la clase de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la presente divulgación puede cambiarse mediante métodos conocidos. Las técnicas normales de cambio de clase se pueden usar para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente divulgación puede cambiarse mediante el 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 divulgación 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 AXL es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos en los que la arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice de la UE como en Kabat et al. supra, está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina (descrita en el documento WO2006033386) y/o en los que la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys. Otros anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados se desvelan en el documento WO2008145142. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación es un anticuerpo de tipo no IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 que ha sido mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, tal como ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Dichas mutaciones, por ejemplo, se han descrito 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 hechas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden genomanipular para que incluyan modificaciones en la región Fc, normalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la presente divulgación puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación, que tienen una afinidad mejorada por AXL. Dichas variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración por afinidad que incluyen la mutación de las CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), la combinación de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), mezcla de ADN (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), exhibición de fagos (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estos métodos de maduración por afinidad.

45 En algunas realizaciones, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de restos de cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Este enfoque se describe además en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 por Bodmer et al. El número de restos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, 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 divulgación se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las mutaciones siguientes: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, se puede alterar el anticuerpo en la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.869.046 y 6.121.022 por Presta et al.

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

En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos se pueden sustituir por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.194.551 de Idusogie et al.

En algunas realizaciones, se alteran uno o más restos de aminoácidos para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer et al. En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, de sus siglas en inglés) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Por otra parte, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R. L. et al, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, documento WO2010106180).

En algunas realizaciones, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden generar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región marco variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.714.350 y 6.350.861 por Co et al. Adicional o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o no, o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Las células con la maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la presente divulgación para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación o carecen de restos de fucosilo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse mediante expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. La Publicación de PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono enlazados a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación de PTC WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares genomanipuladas para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, la beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que tales anticuerpos expresados en las líneas celulares genomanipuladas presentan estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Eureka Therapeutics describe además células de mamífero CHO genéticamente modificadas capaces de producir anticuerpos con un patrón de glucosilación de mamífero alterado sin restos de fucosilo (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Alternativamente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse en levaduras u hongos filamentosos genomanipulados para un patrón de glucosilación similar al de un mamífero y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glucosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla en la divulgación es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en el suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Tal como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (CI-CIO) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En algunas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente divulgación. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura et al. y el documento EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la divulgación es un conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación a la

proteína del suero, tal como la albúmina de suero humano o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque se describe, por ejemplo, en Ballance et al. documento EP0322094.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse 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)). Luego, los fragmentos pueden analizarse o seleccionarse para determinar sus propiedades de la misma manera que se describe en el presente documento para anticuerpos de longitud completa. A continuación se describen formatos ejemplares para fragmentos de unión a antígeno específicos de AXL de la divulgación:

- Fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que son fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un enlace disulfuro en la región bisagra. Estos pueden generarse mediante, por ejemplo, el tratamiento de 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. Se pueden obtener fragmentos Fab, por ejemplo, mediante el tratamiento de un anticuerpo IgG con papaína. Se pueden obtener fragmentos Fab', por ejemplo, mediante la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> 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 de cadena simple Fv (scFv)) son construcciones en las que los dominios VL y VH de un fragmento Fv se unen, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite expresarse como una cadena de proteína sencilla 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 tienen al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la molécula de divulgación descrita anteriormente en el presente 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 de un antígeno en una célula efectora humana o mediante la unión de un agente citotóxico o un segundo agente terapéutico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en contraposición con las fases innata y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T que incluyen linfocitos T citolíticos (CTL, de sus siglas en inglés)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, mastocitos y granulocitos, tal como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc (FcR) específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, tal como un linfocito citolítico natural. Por ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR, están implicados en la destrucción específica de las células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede estar regulada por factores humorales tales como citocinas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o fagocitosa 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 en un linfocito B humano, tal como, por ejemplo, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD46, CD80, CD138 y HLA-DR.

En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno específico de tejido, promoviendo la localización del anticuerpo biespecífico a 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 AXL, normalmente un antígeno asociado a tumor (AAT), pero tiene una especificidad de unión diferente de la del primer sitio de unión a antígeno. Dichos anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos pueden mejorar la especificidad de la unión de las células tumorales y/o comprometer múltiples rutas efectoras. Los AAT ejemplares incluyen antígeno carcinoembrionario (ACE), antígeno específico de próstata (AEP), RAGE (antígeno renal), a-fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en 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 (por ejemplo, MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos gangliósidos, tirosinasa, gp75, c-Met, Marti, MelanA, MUM-1, mum- 2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM o una integrina asociada al cáncer, tal como la integrina  $\alpha 5\beta 3$ . Alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un epitopo diferente de AXL. El segundo sitio de

unión a antígeno puede unirse 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, factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de estos, particularmente receptores asociados con la progresión del cáncer, tal como el receptor HER (EGFR, HER2, HER3 o HER4), c-MET o IGF1R.

5 En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno es de un segundo anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación, tal como un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación.

10 Los formatos ejemplares para las moléculas de anticuerpos multiespecíficas de la divulgación incluyen, pero no se limitan a (i) dos anticuerpos reticulados mediante heteroconjugación química, uno con especificidad para AXL y otro con especificidad para un segundo antígeno; (ii) un único anticuerpo que comprende dos regiones de unión a antígeno diferentes; (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que comprende dos regiones de unión a antígeno diferentes, por ejemplo, dos scFv unidos en tándem mediante un conector peptídico adicional; (iv) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y 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, en: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab')<sub>2</sub> 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 cuerpo flexible, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (viii) una llamada molécula de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína cinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una llamada molécula Scorpion, 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 las moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización. Dichas moléculas pueden prepararse utilizando tecnologías conocidas, tales como, por ejemplo, las conocidas como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) y las que se adaptan electrostáticamente (Amgen), LUZ-Y (Genentech), Cuerpo de dominio genomanipulado de intercambio de cadenas (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) y tecnologías DuoBody (Genmab A/S).

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se obtiene o es obtenible a través de un intercambio controlado de brazo Fab, normalmente usando tecnología DuoBody. Los métodos *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos mediante intercambio controlado de brazo Fab se han descrito en los documentos WO2008119353 y WO 2011131746 (ambos por Genmab A/S). En un método ejemplar, descrito en el documento WO 2008119353, se forma un anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de "brazo Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera unida) entre dos anticuerpos mono-específicos, ambos que comprenden regiones CH3 de tipo IgG4, tras la incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender diferentes secuencias. En otro método ejemplar, descrito en el documento WO 2011131746, los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación 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 o CAF de la divulgación de la presente divulgación: a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3; b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc 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 o CAF de la divulgación descripción y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión diferente, o viceversa. Las condiciones reductoras pueden, por ejemplo, proporcionarse mediante la adición de un agente reductor, por ejemplo, seleccionado de 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina. La etapa d) puede comprender además restaurar las condiciones para que no se reduzcan o se reduzcan menos, por ejemplo, mediante la eliminación de un agente reductor, por ejemplo, mediante desalación. Preferentemente, 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 estas interacciones y cómo se pueden lograr en el documento WO 2011131746. Las siguientes son realizaciones ejemplares de combinaciones de dichas mutaciones asimétricas, opcionalmente en donde una o ambas regiones Fc son del isotipo IgG1.

60 En algunas realizaciones, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada 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 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.

65 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 del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409, opcionalmente 409.

5 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 del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, y 407, opcionalmente 405 o 368.

10 En algunas realizaciones, tanto la primera como la segunda región Fc son del isotipo IgG1, con la primera región Fc teniendo una Leu en la posición 405, y la segunda región Fc teniendo una Arg en la posición 409.

15 El anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación puede producirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tales como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación. Por ejemplo, conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica 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, preferentemente 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 divulgación pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariontes adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, de los cuales pueden aislarse posteriormente usando técnicas bien conocidas.

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

30 Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado. El término "vector", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (tal como vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador. Por otra parte, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante se encuentran normalmente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la presente divulgación pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (tales como retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en replicación), que tienen funciones equivalentes.

45 Por tanto, un objeto adicional de la divulgación se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la divulgación.

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

55 Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique 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), pSG1 beta d2-4- (Miyaji H et al. 1990) y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos de integración, tal como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares. Otros ejemplos de vectores víricos incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante transfección de células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos normales de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos en replicación se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877,

US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la divulgación.

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

10 "transformada".

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden usarse para producir un anticuerpo de la presente divulgación en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por 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 insectos y vectores del virus Baculo, y células hospedadoras y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (tal como bacterias) y células eucariotas (tal como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras

15 *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen una célula SP2/0-Agl4 de ratón (ATCC CRL1581), una célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), una célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al; 1980), una célula YB2/3HL.P2.G1 1.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, en lo sucesivo denominada "célula YB2/0"), y similares.

La presente divulgación también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la divulgación, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe 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. Dichas células hospedadoras recombinantes se pueden usar para la producción de anticuerpos de la presente divulgación.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación se conjuga con una fracción terapéutica, es decir, un fármaco. La fracción terapéutica puede ser, por ejemplo, una citotoxina, un agente quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, un estimulador inmunitario, un péptido lítico o un radioisótopo. Dichos conjugados se denominan en el presente documento "conjugados anticuerpo-fármaco" o "CAF".

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una fracción citotóxica. La fracción citotóxica puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorubicina; dihidroxiantracindiona; un inhibidor de tubulina tal como maitansina o un análogo o derivado de la misma; un agente antimitótico tal como monometil auristatina E o F o un análogo o derivado de la misma; dolastatina 10 o 15 o un análogo de la misma; irinotecan o un análogo del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-

45 deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; caliqueamicina o un análogo o derivado de la misma; un antimetabolito tal como el metotrexato, 6 mercaptopurina, 6 tioguanina, citarabina, fludarabina, 5 fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C; un derivado de platino tal como cisplatino o carboplatino; duocarmicina A, duocarmicina SA, raquelmicina (CC-1065), o un análogo o derivado de la misma; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramina (AMC); pirrolo[2,1-c][1,4]-

50 benzodiazepinas (PDB); toxina diftérica y moléculas relacionadas como la cadena A de la difteria y sus fragmentos activos y moléculas híbridas, toxina ricina tal como ricina A o una toxina de la cadena A de la ricina desglucosilada, toxina colérica, una toxina tipo Shiga como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de la tosferina, toxina de tétanos, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modicina, gelanina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, Proteínas de *Phytolacca americana* tal como PAPI, PAPII, y PAP-S, el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina,

60 restrictocina, toxinas de fenomicina y enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina estafilocócica A; proteína antivírica de hierba carmín; toxina de la difteria; y endotoxina de *Pseudomonas*.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una auristatina o un péptido análogo, derivado o profármaco de la misma. Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y

- 5 tienen actividad anticancerosa (US5663149) y antifúngica (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42: 2961-2965. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF (monometil auristatina F) y MMAE (monometil auristatina E). Las auristatinas y los análogos, derivados y profármacos de auristatina adecuados, así como los conectores adecuados para la conjugación de auristatinas con Ac, se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.635.483, 5.780.588 y 6.214.345 y en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO02088172, WO2004010957, WO2005081711, WO2005084390, WO2006132670, WO03026577, WO200700860, WO207011968 y WO205082023.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con pirrolo[2,1-c][1,4] -benzodiazepina (PDB) o un análogo, derivado o profármaco de la misma. Las PDB y derivados de PDB adecuados y las tecnologías relacionadas se describen en, por ejemplo, Hartley J. A. et al., Cancer Res 2010; 70(17): 6849-6858; Antonow D. et al., Cancer J 2008; 14(3): 154-169; Howard P.W. et al., Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 6463-6466 y Sagnou et al., Bioorg Med Chem Lett 2000; 10(18): 2083-2086.
- 15 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una fracción citotóxica seleccionada del grupo que consiste en una antraciclina, maitansina, caliqueamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), dolastatina 10, dolastatina 15, irinotecán, monometil auristatina E, monometil auristatina F, una PDB, o un análogo, derivado o profármaco de cualquiera de las mismas.
- 20 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una antraciclina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con maitansina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con caliqueamicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con duocarmicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con raquelmicina (CC-1065) o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con dolastatina 10 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con dolastatina 15 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con monometil auristatina E o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con monometil auristatina F o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con pirrolo[2,1-c][1,4] -benzodiazepina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con irinotecán o un análogo, derivado o profármaco de la misma.
- 25 En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación se conjuga con un ácido nucleico o una molécula asociada a ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica (ARNasa) o desoxirribonucleasa (por ejemplo, DNasa I), un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidor (por ejemplo, una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN inmunoestimulador que contiene el motivo CpG). En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación se conjuga con un aptámero o una ribozima.
- 30 En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación se conjuga, por ejemplo, como una proteína de fusión, a un péptido lítico tal como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18.
- 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con una citocina, tales como, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFNa, IFN3, IFNy, GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNFa.
- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un conector quelante, por ejemplo, DOTA, DTPA o tiuxetán, que permite que el anticuerpo forme un complejo con un radioisótopo. El anticuerpo también puede o alternativamente comprender o estar conjugado con uno o más aminoácidos radiomarcados u otras moléculas radiomarcadas. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>186</sup>Re, <sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac y <sup>227</sup>Th. Con fines terapéuticos, se puede usar un radioisótopo que emite radiación de partículas beta o alfa, por ejemplo, <sup>131</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi, <sup>67</sup>Cu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re e <sup>212</sup>Pb.
- 45 Las técnicas para conjugar moléculas con anticuerpos, son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Aron et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Véase también, por ejemplo, la publicación de PCT WO 89/12624.) Normalmente, la molécula de ácido nucleico se une covalentemente a lisinas o cisteínas en el anticuerpo, a través de la funcionalidad éster de N-hidroxisuccinimida o maleimida, respectivamente. Se ha
- 50
- 55

informado que los métodos de conjugación utilizando cisteínas genomanipuladas o la incorporación de aminoácidos no naturales mejoran la homogeneidad del conjugado (Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Rittland, M., Hutchins, B. M., Kim, C.H., Kazane, S. A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 16101-16106.; Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010). Engineered thio- trastuzumab-DMI conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2 positive breast cancer. Clin. Cancer Res. 16, 4769-4778.). Junutula et al. (2008) desarrollaron una conjugación específica de sitio basada en cisteína llamada "THIOMAB" (TDC) que se afirma que muestran un índice terapéutico mejorado en comparación con los métodos de conjugación convencionales. La conjugación con aminoácidos no naturales que se han incorporado al anticuerpo también se está explorando para los CAF; sin embargo, la generalidad de este enfoque aún no se ha establecido (Axup et al., 2012). En particular, el experto en la técnica también puede imaginar un polipéptido que contiene Fc genomanipulado con un marcador que contiene glutamina donante de acilo (por ejemplo, marcadores de péptido que contienen Gin o marcadores Q) o una glutamina endógena que se hace reactiva mediante genomanipulación de polipéptidos (por ejemplo, mediante eliminación, inserción, sustitución o mutación de aminoácidos en el polipéptido). Entonces, una transglutaminasa, puede reticularse covalentemente con un agente donante de amina (por ejemplo, una molécula pequeña que comprende o está unida a una amina reactiva) para formar una población estable y homogénea de un conjugado de polipéptido que contiene Fc genomanipulado con el agente donante de amina siendo específico del sitio conjugado con el polipéptido que contiene Fc a través del marcador que contiene glutamina donante de acilo o la glutamina endógena accesible/expuesta/reactiva (documento WO 2012059882).

En otro aspecto, la divulgación se refiere al anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación, como se define en cualquier aspecto o realización en el presente documento, para su uso como un medicamento.

Los anticuerpos monoclonales humanos o CAF de la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento o prevención de trastornos que implican células que expresan AXL.

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente divulgación con el propósito de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) síntomas o estados de una enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" es normalmente un ser humano que responde al anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la modulación de la función AXL o mediante la destrucción de la célula, directa o indirectamente.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación en presencia de células efectoras capaces de inducir una respuesta de célula efectora mediada por Fc tal como una respuesta CDC, ADCC o ADCP. En esta realización, el anticuerpo es normalmente de longitud completa y de un isotipo que conduce a una respuesta CDC o ADCC, tal como, por ejemplo, un isotipo IgG1. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para destruir una célula que expresa AXL poniendo en contacto la célula con un CAF de la divulgación.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación es particularmente adecuado para el tratamiento del cáncer. Las células cancerosas que sobreexpresan AXL son, de hecho, buenas dianas para los anticuerpos monoclonales humanos o CAF de la divulgación, ya que pueden unirse más anticuerpos o CAF por célula. Por tanto, en un aspecto, el trastorno que implica células que expresan AXL es cáncer, es decir, un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan AXL que incluye, por ejemplo, trastornos en los que las células son de un tumor sólido o hematológico. En particular, el anticuerpo monoclonal antihumano o CAF de la divulgación puede usarse como tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas con la expresión, sobreexpresión o activación de AXL y/o Gas6. No existen limitaciones particulares en los tejidos tumorales, y los ejemplos incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tumores de células gliales tal como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, sarcomas, cánceres hematológicos (leucemias), astrocitomas y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres más preferidos son cáncer de glioma, gástrico, pulmón, pancreático, de mama, próstata, renal, hepático y endometrial.

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos o CAF de la divulgación son posibles activadores de la respuesta inmunitaria innata y pueden usarse en el tratamiento de trastornos inmunitarios humanos, tales como sepsis, pueden usarse como adyuvantes para inmunización, tal como vacunas, y pueden usarse como agentes antiinfecciosos (contra bacterias, virus, parásitos).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación puede proteger o tratar enfermedades tromboticas tales como trombosis venosa y arterial y aterotrombosis. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación puede proteger, prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación puede prevenir o inhibir la entrada de virus tales como los virus Lassa y Ébola y puede usarse para tratar infecciones víricas.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Las dosis eficaces y los regímenes de dosificación para el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinadas por los expertos en la técnica. Un médico con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría comenzar las dosis del anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación empleada en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente divulgación será la cantidad del compuesto que es 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 puede medirse mediante su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede, por ejemplo, evaluarse en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir citotoxicidad mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada. Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la presente divulgación 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, aproximadamente, tal como, 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 8 mg/kg. Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un CAF específico de AXL de la divulgación 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, por ejemplo, ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, administrarse 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 único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. En algunas realizaciones, la ventana de eficacia-seguridad se optimiza mediante la disminución de la toxicidad específica tal como, por ejemplo, mediante la disminución de la relación fármaco-anticuerpo (RFA) y/o la mezcla de CAF específico de AXL con anticuerpo monoclonal humano no marcado de la divulgación. En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento se controla durante la terapia, por ejemplo, en puntos predefinidos en el tiempo. En algunas realizaciones, la eficacia se puede controlar mediante la medición del nivel de AXL 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 el presente documento, por ejemplo, mediante la realización de una o más exploraciones PET-CT, por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación, fragmento o mini-anticuerpo marcado procedente del anticuerpo monoclonal humano o CAF de la presente divulgación. 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 durante el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos o CAF de la divulgación se administran mediante infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario no deseado. Una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación también se puede administrar usando un período de dosificación semanal, cada dos semanas o cada tres semanas. El período de dosificación puede restringirse a, por ejemplo, 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica. A modo de ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse como una dosificación diaria de un compuesto de la presente divulgación 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, al día, 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, 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 los mismos.

5 La divulgación también proporciona aplicaciones terapéuticas donde un anticuerpo o CAF de la divulgación se usa en combinación con al menos un agente terapéutico adicional relevante para la enfermedad o trastorno a tratar, como se ha descrito anteriormente. Dicha administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado.

10 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno que implica células que expresan AXL como se describe anteriormente, métodos que comprenden la administración de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación combinada con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La presente divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación para  
15 la preparación de una composición farmacéutica que se administrará con al menos un agente quimioterapéutico para tratar dicho trastorno.

El agente terapéutico adicional es normalmente relevante para el trastorno a tratar. Los agentes terapéuticos  
20 ejemplares incluyen otros anticuerpos anticancerosos o CAF, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inmunógenos anticancerosos, agentes reguladores del control del ciclo celular/apoptosis, agentes reguladores hormonales y otros agentes que se describen a continuación.

En un aspecto, el agente terapéutico adicional es al menos un segundo anticuerpo o CAF que se une a otra diana tal  
25 como, por ejemplo, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD80, CD126, B7, MUC1, tenascina, HM 1,24 o HLA-DR. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede unirse a un antígeno de linfocitos B, incluyendo, pero sin limitación, CD20, CD19, CD21, CD23, CD38, CD46, CD80, CD138, HLA-DR, CD22, o a otro epítipo en AXL. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo se une al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, de sus siglas en inglés). En algunas  
30 realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación es para su uso en combinación con un anticuerpo terapéutico específico. Los anticuerpos monoclonales utilizados actualmente como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que son adecuados para su inclusión en las combinaciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), y BL22. Otros ejemplos incluyen anticuerpos anti-CTLA4 (por  
35 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 [por ejemplo, Rituximab (Roche), Ibritumomab tiuxetan (Bayer Schering), Tositumomab (GlaxoSmithKline), AME-133v (Applied Molecular Evolution), Ocrelizumab (Roche), Ofatumumab (HuMax- CD20, Gemnab), TRU-015 (Trubion) y IMMUN-106 (Immunomedics)], un anticuerpo anti-CD22  
40 [por ejemplo, Epratuzumab, Leonard et al., *Clinical Cancer Research* (2004) 10: 5327-5334], anticuerpos anti-CD79a, anticuerpos anti-CD27, o anticuerpos anti- CD19 (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 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, descrito previamente por De Benedetti et al., *J Immunol* (2001) 166: 4334-4340 y por Suzuki et al., *Europ J of Immunol* (1992) 22 (8) 1989-1993].  
45

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. La expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a compuestos químicos que son  
50 eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileniofosfaorarnida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina);  
55 criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales  
60 como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina (11 y caliqueamicina 211, véase, por ejemplo, Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caninomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluida la morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idanrbicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico,  
65

nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodoirubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, 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, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofílinico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxana; rizoxina; sizofiran; spirogennanium; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobromtol; mitolactol; pipobromano; 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 tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; 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 los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona en tumores tales como los antiestrógenos, incluido, por ejemplo, el tamoxifeno, raloxifeno, inhibidor de la aromatasas 4(5)-imidazoles, 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 o CAF de la divulgación 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 mediante la interferencia con moléculas específicas ("dianas moleculares") que está implicadas 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 con un inhibidor de tirosina cinasa. La expresión "inhibidor de tirosina cinasa" se refiere a cualquiera de una variedad de agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de tirosina cinasas receptoras y/o no receptoras. Los inhibidores de la tirosina cinasa y los compuestos relacionados son bien conocidos en la técnica y se describen en la publicación de patente de Estados Unidos 2007/0254295. Un experto en la técnica apreciará que un compuesto relacionado con un inhibidor de tirosina cinasa recapitulará el efecto del inhibidor de tirosina cinasa, por ejemplo, el compuesto relacionado actuará en un miembro diferente de la ruta de señalización de tirosina cinasa para producir el mismo efecto que un inhibidor de la tirosina cinasa de esa tirosina cinasa. Los ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para su uso en métodos de realizaciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, 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), leflunomide (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 (8-[4-aminociclobutil]fenil]-9-fenil-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naftiridin-3(2H)-ona clorhidrato) derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Inhibidores adicionales de tirosina cinasa y compuestos relacionados adecuados para su uso en la presente divulgación se describen en, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos 2007/0254295, las patentes de Estados Unidos 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 tirosina cinasa es un inhibidor de cinasa 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 preferentemente al menos un ensayo clínico de fase II, incluso más preferentemente al menos un ensayo clínico de fase III y lo más preferentemente aprobado por la FDA para al menos una indicación hematológica u oncológica. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero sin limitación, 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, Motasenib, 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 e PD-0325901.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación 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 (Inhibitors of erbB-1 kinase; Expert Opinion on Therapeutic Patents Diciembre de 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 febrero de 2006, Vol. 16, N.º 2, Páginas 147-164. Peter Traxler Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment (Part II). Expert Opinion on Therapeutic Patents diciembre de 1998, Vol. 8, N.º 12, Páginas 1599-1625). Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas orgánicas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen AcM 579 (ATCC CRL HB 8506), AcM 455 (ATCC CRL HB8507), AcM 225 (ATCC CRL 8508), AcM 528 (ATCC CRL 8509) (véase, patente de Estados Unidos n.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano remodelado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo totalmente humano dirigido a EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen con EGFR mutante de tipo II (patente de Estados Unidos n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales 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 EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR; y AcM 806 o AcM 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunocombinado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas orgánicas pequeñas 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 pan-HER de molécula orgánica pequeña tal como dacomitinib (PF-00299804). En algunas realizaciones, el inhibidor de HER se selecciona del grupo que consiste en 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 (Desmethyl 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 cíclica dependiente de AMP e inhibidor de 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.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación 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 desvela en, por ejemplo, el documento WO2006/015371; Jin et al, Cancer Res (2008) 68:4360. Otros anticuerpos anti-c-met adecuados para su uso en los métodos de la divulgación se describen en el presente documento y se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos anti-c-met desvelados en el documento WO05/016382 (incluidos, entre otros, los anticuerpos 13.3.2, 9.1.2, 8.70.2, 8.90.3); un anticuerpo anti-c-met producido 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  $\beta$  del receptor HGF, y dicho epítipo es el mismo que el reconocido por el anticuerpo monoclonal); anticuerpos anti-c-met desvelados en el documento WO2007/126799 (incluidos, entre otros, 04536, 05087, 05088, 05091, 05092, 04687, 05097, 05098, 05100, 05101, 04541, 05093, 05094, 04537, 05102, 05105, 04696, 04682); anticuerpos anti-c-met desvelados en el documento WO2009/007427 (incluidos, pero sin limitación, un anticuerpo depositado en CNCM, Instituto 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 desvelado en el documento 20110129481; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento US20110104176; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2009/134776; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2010/059654; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2011020925 (que incluye, pero sin limitación, un anticuerpo secretado de un hibridoma depositado en el CNCM, Instituto 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 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. Patentes 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 el documento WO 2008/017361; el documento WO 2008/145242; el documento WO2008/145243; el documento WO 2008/148449; el documento WO 2009/007074; el documento WO 2009/006959; el documento WO 2009/024221; el documento WO 2009/030333; y/o el documento 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 el documento 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 o CAF de la divulgación se usa en combinación con un agente inmunoterapéutico. La expresión "agente inmunoterapéutico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto, composición o tratamiento que mejora, estimula o aumenta indirectamente o directamente la respuesta inmunitaria del cuerpo contra las células cancerosas y/o que disminuye los efectos secundarios de otras terapias contra el cáncer. Por lo tanto, la inmunoterapia es una terapia que estimula o mejora directa o indirectamente las respuestas del sistema inmunitario a las células cancerosas y/o disminuye los efectos secundarios que pueden haber sido causados por otros agentes anticancerígenos. La inmunoterapia también se conoce en la técnica como terapia inmunológica, terapia biológica, terapia modificadora de la respuesta biológica y bioterapia. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, 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 inmunitarias (linfocitos T, NK, las células, células dendríticas, linfocitos B...).

Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser inespecíficos, es decir, que estimulan el sistema inmunitario en general para que el cuerpo humano se vuelva 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 células cancerosas. Los regímenes de inmunoterapia 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 inmunitario. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se han utilizado solos como terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como además de una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico no específico funciona como un adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (por ejemplo, vacunas contra el cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos no específicos también pueden funcionar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, la supresión de la médula ósea inducida por ciertos agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos pueden actuar sobre las células clave del sistema inmunitario 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.

Varias citocinas han encontrado aplicación en el tratamiento del cáncer como inmunoterapias generales no específicas diseñadas para estimular el sistema inmunitario o como adyuvantes provistos con otras terapias. Las citocinas adecuadas incluyen, pero sin limitación, interferones, interleucinas y factores estimuladores de colonias. Los interferones (IFN) contemplados por la presente divulgación incluyen los tipos comunes de IFN, IFN-alfa (IFN- $\alpha$ ), IFN-beta (IFN- $\beta$ ) e IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ). Los IFN 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 así que las células cancerosas sean más fáciles de reconocer y destruir por el sistema inmunitario. Los IFN también pueden actuar indirectamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, ralentizando la angiogénesis, estimulando el sistema inmunitario y/o estimulando los linfocitos citolíticos 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 divulgación incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12. Los ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles comercialmente incluyen Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Washington) está probando actualmente una forma recombinante de IL-21, que también se contempla para su uso en las combinaciones de la presente divulgación. Los factores estimulantes de colonias (CSF, de sus siglas en inglés) contemplados por la presente divulgación 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 (epoetina 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 quimioterapia tradicional. Por consiguiente, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y puede permitir el uso de dosis más altas de agentes quimioterapéuticos. Varios factores estimulantes de colonias recombinantes están disponibles comercialmente, por ejemplo, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (eritropoietina; Ortho Biotech), Epogen (eritropoietina; Amgen), Arnesp (eritropoietina).

Las composiciones combinadas y los métodos de administración combinados de la presente divulgación también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "células enteras" y "adoptivas". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender la infusión o reinfusión de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, de sus siglas en inglés), tales como los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ (por ejemplo, los linfocitos T expandidos con antígenos específicos de tumor y/o mejoras genéticas), linfocitos B que expresan anticuerpos u otras células productoras o presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas cultivadas con un agente de expansión DC como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas de antígeno asociadas a tumores), células NK antitumorales, las llamadas células híbridas, o combinaciones de las mismas. Los lisados celulares también pueden ser útiles en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics), y lisados celulares 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 con adyuvantes como el alumbre, también pueden ser componentes en dichos métodos y composiciones combinadas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o CAF de la divulgación se usa en combinación con radioterapia. La radioterapia puede comprender radiación o administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que está siendo tratado (el tratamiento de radiación puede, por ejemplo, ser en forma de radioterapia de haz externo (EBRT, de sus siglas en inglés) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que pueden usarse en la práctica de dichos 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 anti-Axl o el conjugado anticuerpo-fármaco se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-Axl o un conjugado anticuerpo-fármaco puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo 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. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 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 dosis y el régimen naturalmente dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden formularse para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

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

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

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

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

bacterias y hongos.

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

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

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

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

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

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

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis o se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Ocurrirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

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

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como la 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. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas es generalmente conocido por

los expertos en la técnica.

Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$ ) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente divulgación, y dichas partículas pueden fabricarse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (denominadas también vesículas multilamelares (MLV, de sus siglas en inglés)). Las MLV tienen generalmente diámetros desde 25 nm a 4  $\mu\text{m}$ . La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV, de sus siglas en inglés) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

#### FIGURAS:

La **Figura 1** muestra que el anticuerpo monoclonal humano D4 induce la degradación del receptor AXL de manera más eficaz que el anticuerpo D9 desvelado en el documento WO 2012175691.

La **Figura 2** muestra que el anticuerpo monoclonal humano scFv-Fc D4 induce la homodimerización del receptor AXL de manera más eficaz que el anticuerpo D9 desvelado en el documento WO 2012175691.

La **Figura 3** muestra la proliferación de las líneas celulares CML K562-S y K562-R, después de un tratamiento de 3 días con el anticuerpo Cetuximab (control negativo), el anticuerpo monoclonal murino D9 y el anticuerpo monoclonal humano D4 solo o en combinación con Nilotinib.

La **Figura 4** muestra la proliferación de líneas celulares GIST48 e IB135 GIST, después de un tratamiento de 3 días con el anticuerpo Cetuximab (control negativo), el anticuerpo monoclonal murino D9 y el anticuerpo monoclonal humano D4 solo o en combinación con Imatinib.

La **Figura 5**: Modelos de xenoinjerto para investigar los efectos de los anticuerpos anti-Axl sobre el cáncer de páncreas humano en ratones desnudos. Se implantaron BXP3 (células de cáncer de páncreas) en el flanco derecho de ratones atímicos desnudos. Los animales recibieron 300  $\mu\text{g}$ /inyección del anticuerpo monoclonal antihumano de ratón (D9) o anticuerpo monoclonal completamente humano (D4). Durante el tratamiento, se monitorizó el crecimiento de tumores una vez por semana con un calibrador.

La **Figura 6**: muestra que el anticuerpo monoclonal humano D4 es capaz de reaccionar de forma cruzada entre la forma murina y humana de AXL.

#### Ejemplos:

##### EJEMPLO 1:

Los inventores generaron en el laboratorio AcM humanos completos específicos para el dominio extracelular del receptor AXL y seleccionaron uno (es decir, el anticuerpo monoclonal humano D4) capaz de inducir la internalización y degradación del receptor AXL en la membrana de la superficie celular (Figura 1) y reaccionar de forma cruzada entre la forma murina y humana de AXL (Figura 6). El anticuerpo es capaz de inducir homodimerización del receptor (Figura 2). En consecuencia, las células tumorales tratadas con este AcM mostraron una disminución dramática de la presencia del receptor AXL en su superficie celular y las células tratadas ya no son capaces de responder a GAS6, el ligando natural de AXL. Esto también dio como resultado una inhibición de la fosforilación de AXL, así como una fuerte inhibición de la proliferación celular *in vitro*. Se demostró que el tratamiento con el AcM anti-AXL restaura la sensibilidad al Nilotinib de las células CML resistentes que sobreexpresan AXL (Figura 3). Por otra parte, se ha observado el mismo efecto en las células GIST resistentes a Imatinib tratadas (Figura 4).

##### EJEMPLO 2: EL ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO DE LA DIVULGACIÓN REDUCE EL CRECIMIENTO DEL CÁNCER PANCREÁTICO *IN VIVO*

Todos los experimentos *in vivo* se realizaron de acuerdo con las pautas francesas para estudios experimentales con animales (Acuerdo n.º C34-172-27). Se compraron ratones desnudos atímicos hembra de seis semanas de edad a Harlan. Se implantaron células de carcinoma pancreático ( $3,5 \times 10^6$ , BXP3) en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos. Los ratones portadores de tumores se aleatorizaron en diferentes grupos de tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm<sup>3</sup>. Los ratones se trataron mediante inyecciones

intraperitoneales con vehículo (NaCl al 0,9 %); un anticuerpo monoclonal anti-AXL de ratón 20G7-D9 (D9), o el anticuerpo monoclonal humano D4 solo a 300 µg/inyección (dos veces por semana durante 4 semanas consecutivas). El volumen tumoral se midió semanalmente con un calibrador. Los anticuerpos anti-AXL y, en particular, el anticuerpo humano D4 disminuyen el crecimiento tumoral de los xenoinjertos pancreáticos (Figura 5).

- 5 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Inserm
- 10 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS Y CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO CONTRA AXL
- <130> BIO13300 ROBERT / MC
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial
- 25 <220>  
<223> Región VH del anticuerpo D4
- <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	Tyr	20	25	30	
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Arg	Tyr	Ile	Tyr	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	Gly	Arg	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Tyr	His	Trp	Gly	Arg	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115												

- 30 <210> 2  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 764 299 T3

<220>

<223> Región VL del anticuerpo D4

5 <400> 2

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

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

Met Ile Tyr Glu Asp Ser Lys 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 Lys Lys Asp Asp Tyr Ser  
 85 90 95

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal humano contra AXL que comprende una cadena pesada que comprende:

- 5       - una H-CDR1 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 31 hasta el resto de aminoácido en la posición 35 en la SEQ ID NO: 1,  
      - una H-CDR2 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 50 hasta el resto de aminoácido en la posición 66 en la SEQ ID NO: 1, y  
10       - una H-CDR3 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 99 hasta el resto de aminoácido en la posición 108 en la SEQ ID NO: 1,

y una cadena ligera que comprende:

- 15       - una L-CDR1 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 23 hasta el resto de aminoácido en la posición 36 en la SEQ ID NO: 2,  
      - una L-CDR2 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 52 hasta el resto de aminoácido en la posición 58 en la SEQ ID NO: 2, y,  
20       - una L-CDR3 definida mediante la secuencia que va desde el resto de aminoácido en la posición 91 hasta el resto de aminoácido en la posición 100 en la SEQ ID NO: 2.

2. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 que es un anticuerpo que comprende una cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera idéntica a la SEQ ID NO: 2.

25 3. Un fragmento del anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 que se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> y diacuerpos.

4. Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo humano de la reivindicación 1.

30 5. Un vector que comprende una molécula nucleica de la reivindicación 4.

6. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 5.

35 7. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 que se conjuga con una fracción terapéutica seleccionada del grupo que consiste en una citotoxina, un agente quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor, un estimulador inmunitario, un péptido lítico y un radioisótopo.

8. El monoclonal humano de la reivindicación 7 que se conjuga con auristatina.

40 9. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 o 7 para su uso como un medicamento.

10. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 o 7, para su uso en el tratamiento del cáncer.

11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1 o 7.

MDA-MB-231

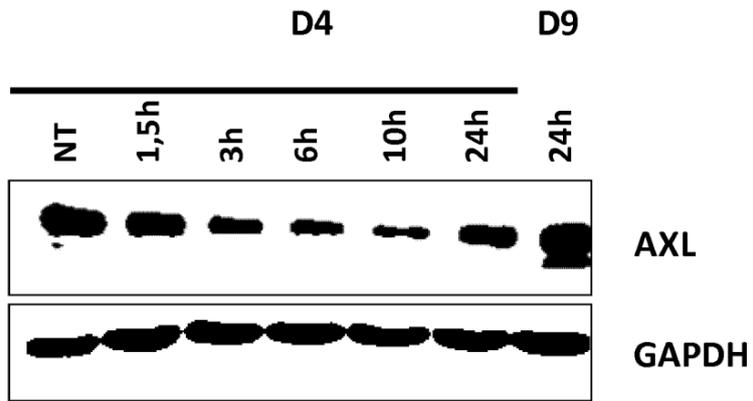


Figura 1

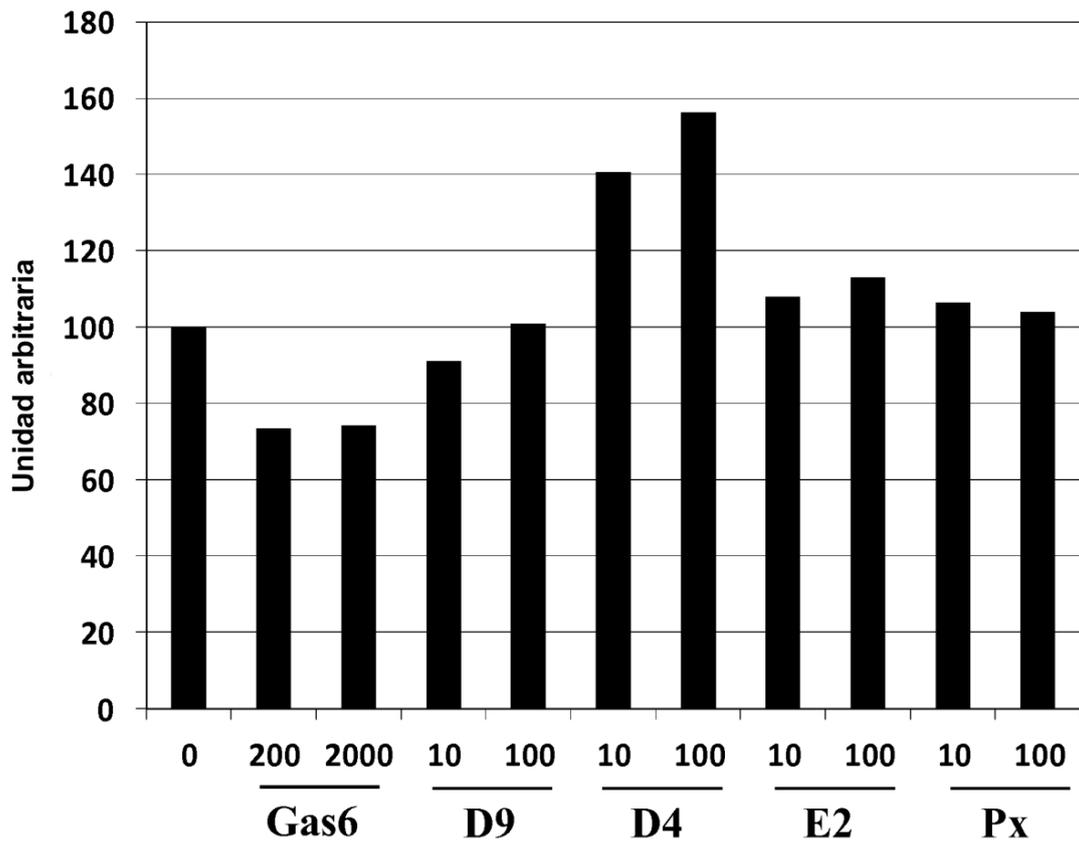


Figura 2

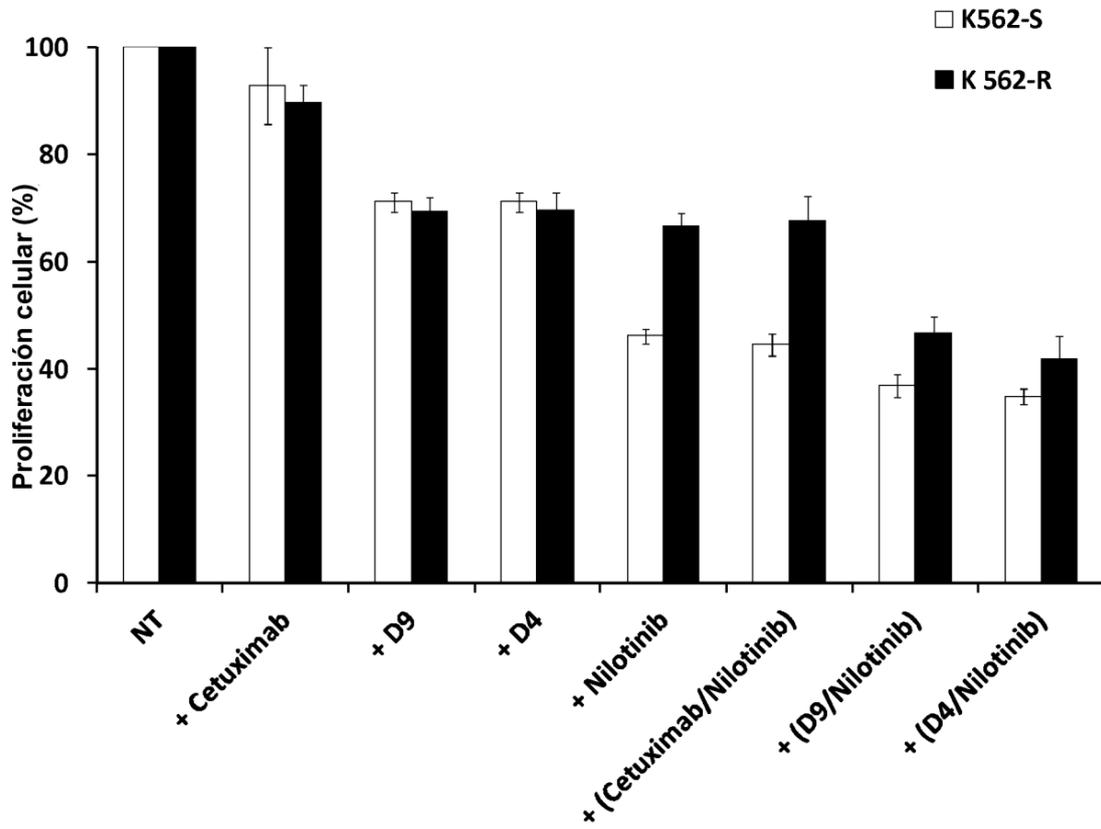


Figura 3

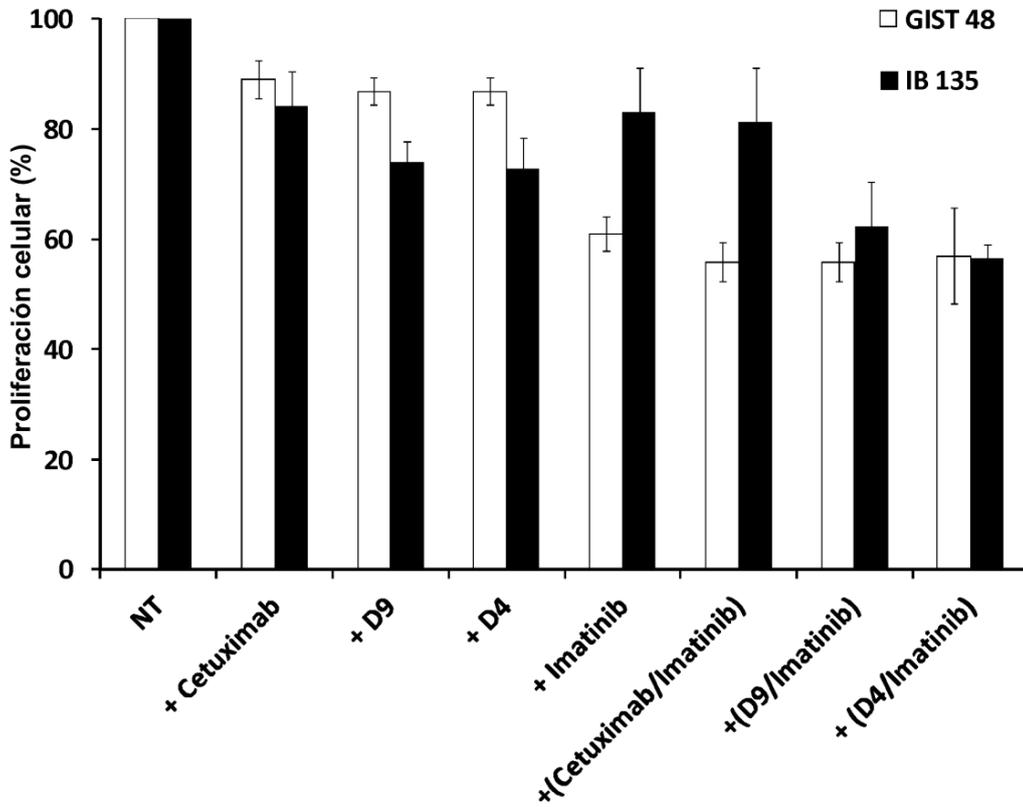


Figura 4

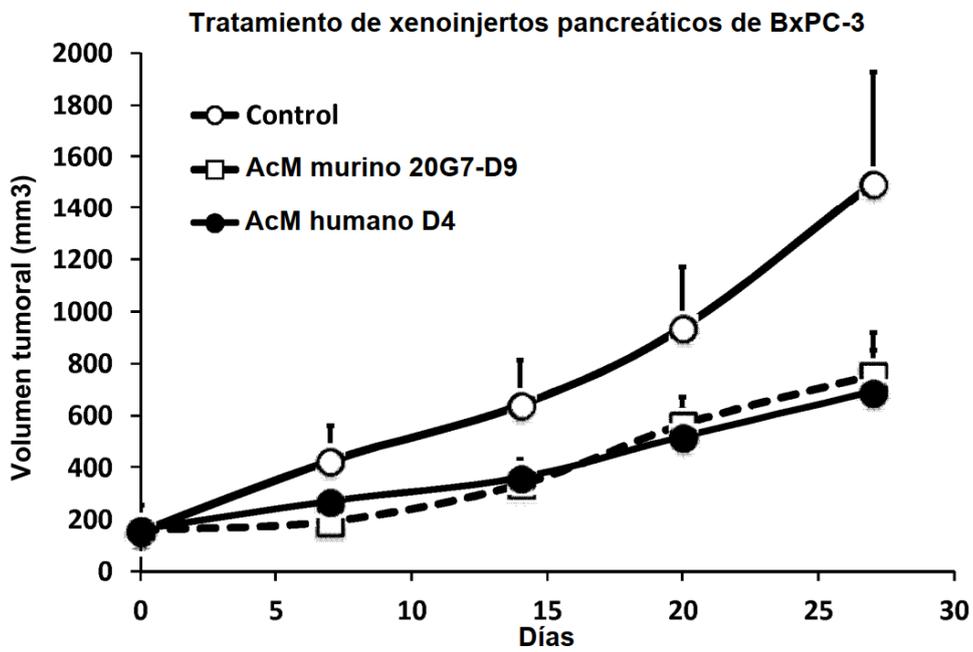


Figura 5

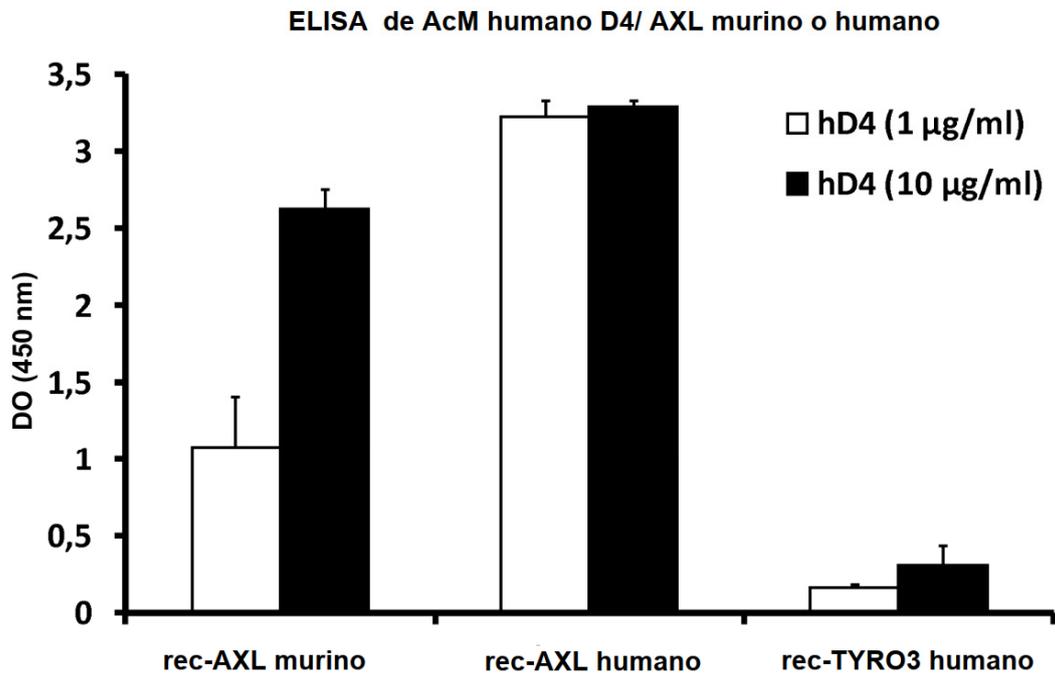


Figura 6