C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, y uso del mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y la medicina, en particular a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a un antígeno del mismo que se une específicamente a AXL. La invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo, vectores de expresión, células huésped y métodos para producir los mismos, métodos para producir los anticuerpos según la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo según la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo según la invención y otros compuestos terapéuticamente activos, métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL, usos de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de los mismos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL, y usos de los anticuerpos y otros compuestos terapéuticamente activos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales en forma de moléculas quiméricas, humanizadas o totalmente humanas han demostrado su utilidad como medicamentos eficaces para tratar múltiples trastornos y enfermedades.

El receptor de tirosina cinasa Axl (ARK, TYRO7 y UFO) pertenece a la familia de receptores de macrófagos asociados a tumores (TAM) compuesta por TYRO-3, AXL y MER. Estructuralmente, los receptores TAM comprenden dos dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), dos porciones de fibronectina tipo III (FNIII) en el dominio extracelular, y la secuencia conservada de aminoácidos KW(I/L)A(I/L)ES en el dominio cinasa del mismo. Gas6 (growth arrest specific 6, o gen específico de supresión de crecimiento 6) es un ligando de Axl. Axl, activado por la unión de Gas6, propaga la señal a través de la fosforilación.

Se ha demostrado que la AXL está sobre expresada en varias neoplasias malignas. La sobreexpresión o activación de AXL está estrechamente relacionada con la proliferación, supervivencia, migración e invasión celular mediante la activación de vías de señalización oncogénicas, incluidas las vías PI3K/Akt y/o MAPK/Erk. Por todo ello, AXL es una diana prometedora en el tratamiento antitumoral.

Se ha descubierto que AXL se sobre expresa en muchos tipos de cáncer, como los de pulmón, hígado, riñón, colon, estómago, ovario, páncreas y glioblastoma.

Los documentos de patente WO2015193428, WO2015193430, WO2017220695, WO2017180842 proporcionan varios anticuerpos contra AXL.

Es necesario crear nuevos anticuerpos que se unan específicamente a la AXL y tengan parámetros elevados de afinidad de unión al antígeno AXL.

Divulgación de la invención

Los autores del presente grupo de invenciones han desarrollado anticuerpos que se unen específicamente a la AXL y tienen altos parámetros de afinidad de unión a la AXL. Los autores del presente grupo de invenciones han desarrollado sorprendentemente anticuerpos que se unen específicamente al segundo dominio de tipo inmunoglobulina de AXL (AXL-Ig2), a un fragmento de AXL que comprende los dominios de tipo inmunoglobulina primero y segundo de AXL (AXL-Ig1-Ig2), así como a la porción extracelular completa de AXL (ExcAXL), pero no se unen individualmente al primer dominio de tipo inmunoglobulina de AXL (AXL-Ig1). Los anticuerpos contra AXL según la presente invención inhiben la unión de AXL y GAS6, lo que conduce a la activación de la señalización celular mediada por AXL. Los anticuerpos contra AXL según la presente invención presentan las propiedades de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Los anticuerpos contra AXL según la presente invención tienen alta estabilidad de agregación y alta estabilidad en suero sanguíneo humano. Además, los anticuerpos contra AXL según la presente invención presentan actividad antitumoral y no presentan toxicidad ni efectos irritantes locales.

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

El término "KD" en esta descripción se refiere a la constante de afinidad (o constante de equilibrio), que se calcula a partir de la relación entre Kd y Ka (es decir, Kd/Ka), y se expresa como una concentración molar (M).

La "afinidad de unión" suele referirse a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca (característica, verdadera) que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera de unión Y puede representarse generalmente mediante la constante de afinidad (KD). El valor Kd preferido es de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM,

4 nM, 2 nM, 1 nM, o menos. La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente descripción. Los anticuerpos de baja afinidad suelen unirse a un antígeno de forma lenta y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad suelen unirse a un antígeno de forma más rápida y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente invención.

El término "Kd", "koff" o "kdis" se refiere a la constante de velocidad de disociación de una determinada interacción entre una molécula de unión y un antígeno. La constante de velocidad de disociación koff puede medirse mediante interferometría de biocapa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El término "Ka", "kon" o "on-rate" se refiere a la constante de velocidad de asociación.

El término "R^2" se refiere al coeficiente de determinación.

El término "Respuesta" se refiere a una señal de unión anticuerpo-antígeno.

El término "in vitro" se refiere a una entidad biológica, un proceso biológico o una reacción biológica fuera del cuerpo en condiciones artificiales. Por ejemplo, una célula cultivada in vitro debe entenderse como una célula cultivada en un entorno externo al cuerpo, por ejemplo, en un tubo de ensayo, un vial de cultivo o una placa microtituladora.

El término "ED_{50}" (EC_{50}) (dosis/concentración efectiva del 50%) se refiere a las concentraciones de una formulación que producen un 50% de efecto biológico (que puede incluir citotoxicidad).

"Esquema de numeración de Kabat" o "numeración según Kabat", tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere al sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (Kabat et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, se entenderá que las palabras "incluir" y "comprender", o variaciones de las mismas como "incluye", "incluyendo", "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Anticuerpo

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo que se sintetiza y aísla como una población clonal individual de células.

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo recombinante.

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencia(s) nucleotídica(s) que codifica(n) un anticuerpo, en la que dicha(s) secuencia(s) nucleotídica(s) no está(n) asociada(s) a la célula en la naturaleza.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, que comprende:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y

CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,

CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y

CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

Los anticuerpos monoclonales según la invención se unen específicamente a fragmentos de AXL, que comprenden un dominio 2 del tipo C2 similar a Ig distinto de AXL (AXL-Ig2) o dominio 1 de tipo C2 similar a Ig y dominio 1 de tipo C2 similar a Ig (AXL-Ig1-Ig2), y a la porción extracelular completa de AXL (ExcAXL) pero no se unen a fragmentos de AXL que comprenden un dominio 1 de tipo C2 similar a Ig distinto (AXL-Ig1). Los anticuerpos monoclonales contra AXL según la presente invención inhiben la unión de AXL y GAS6, lo que conduce a la activación de la señalización celular mediada por AXL.

En una realización de la invención, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo aislado.

El término "aislado" utilizado para describir varios anticuerpos según la presente descripción se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y aislado y/o regenerado a partir de una célula o cultivo celular, en el que se expresa el anticuerpo. Las impurezas (componentes contaminantes) del entorno natural son materiales que suelen interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. El polipéptido aislado suele prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig), tal como se utiliza en la presente descripción, incluye los anticuerpos enteros. El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada como VH en la presente descripción) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera está formada por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de la cadena ligera. Preferentemente la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante CL es preferentemente C kappa (κ).

Los anticuerpos según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferentemente IgG), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferentemente IgG1).

Las regiones VL y VH pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas entre regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de unión al antígeno" del anticuerpo o "fragmento de unión al antígeno", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno del anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Entre los ejemplos de fragmentos de unión que se incluyen en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) el fragmento Fab, fragmento monovalente, que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento F(ab')2, fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmento Fd, que consiste en dominios VH y CH1; (iv) fragmento Fv, que consiste en dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH/VHH. Además, dos regiones del fragmento Fv, VL y VH, están codificadas por genes diferentes, pueden unirse mediante métodos recombinantes utilizando un enlazador sintético que permite recibirlas como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se supone que dichas moléculas monocatenarias también se incluyen dentro del término "porción de unión al antígeno" del anticuerpo. Dichos fragmentos de anticuerpos se producen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y estos fragmentos se examinan de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El anticuerpo de la presente invención "que se une específicamente" a un antígeno diana se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno con suficiente afinidad como para que el anticuerpo pueda utilizarse como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula o tejido que exprese el antígeno, y que reaccione ligeramente de forma cruzada con otras proteínas.

El término "se une específicamente a" un polipéptido concreto o a un epítopo de un polipéptido diana concreto puede describirse mediante el ejemplo de una molécula que tenga una Kd para la diana de al menos unos 200 nM, o al menos unos 150 nM, o al menos unos 100 nM, o al menos unos 60 nM o al menos aproximadamente 50 nM, o al menos aproximadamente 40 nM, o al menos aproximadamente 30 nM, o al menos aproximadamente 20 nM, o al menos aproximadamente 10 nM, o al menos aproximadamente 8 nM, o al menos aproximadamente 6 nM, o al menos aproximadamente 4 nM, o al menos aproximadamente 2 nM, o al menos aproximadamente 1 nM, o inferior.

En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un determinado polipéptido o epítopo en un determinado polipéptido sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo en un polipéptido.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es un anticuerpo IgG de longitud completa.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es un anticuerpo IgG de longitud completa que es de isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es un anticuerpo IgG de longitud completa que es de isotipo IgG1 humano.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende mutaciones en el fragmento Fc, que conducen a un aumento de las propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende, en el fragmento Fc, las mutaciones S239D e I332E, según el esquema de numeración de aminoácidos de anticuerpos de la UE (Edelman G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) pp. 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende deleciones 446G y 447K en el fragmento Fc, según el esquema de numeración UE de aminoácidos de anticuerpos, en la región CH3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal incluye:

(i) (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;

o

(ii) a) una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es un anticuerpo que se selecciona del grupo: 01_004 y 01_004_2.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es el anticuerpo 01_004.

Anticuerpo 01_004 incluye:

(a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

El anticuerpo 01_004 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

El anticuerpo 01_004 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

(ii) CDR2 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y

(iii) CDR3 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,

(ii) CDR2 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y

(iii) CDR3 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo 01_004 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4,

(ii) CDR2 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y

(iii) CDR3 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,

(ii) CDR2 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y

(iii) CDR3 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AXL es el anticuerpo 01_004_2.

El anticuerpo 01_004_2 incluye:

(a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

El anticuerpo 01_004_2 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

El anticuerpo 01_004_2 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

(ii) CDR2 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y

(iii) CDR3 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,

(ii) CDR2 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y

(iii) CDR3 (Kabat) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo 01_004_2 incluye:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

(i) CDR1 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4,

(ii) CDR2 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y

(iii) CDR3 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,

y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10,

(ii) CDR2 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y

(iii) CDR3 (Chothia) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Las regiones hipervariables de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (LCDR1, 2, 3 y HCDR1, 2, 3) de todos los anticuerpos anteriores se proporcionan de acuerdo con la nomenclatura de Kabat y Chothia. Los expertos apreciarán que las regiones hipervariables de dominios variables de cadenas ligeras y pesadas (LCDR1, 2, 3 y HCDR1, 2, 3) también pueden representarse de acuerdo con otro esquema de numeración comúnmente conocido, por ejemplo, IMGT o AbM. Por lo tanto, todos los anticuerpos anteriores que se caracterizan por medio de regiones hipervariables de dominios variables de cadenas

ligeras y pesadas (LCDR1, 2, 3 y HCDR1, 2, 3) utilizando el esquema de numeración IMGT o AbM también se incluyen en la presente invención.

Molécula de ácido nucleico

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL.

En cualquiera de dichas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse.

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica" o "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN de cadena simple, o productos de transcripción de dichos ADN.

A menos que se indique lo contrario, el término secuencia de nucleótidos abarca su complemento. Por lo tanto, un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que se identifica y separa de al menos una molécula-impureza de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en que se encuentra en condiciones naturales. Así, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18-22. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de dichas secuencias de nucleótidos.

Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la redundancia del código genético, una variedad de secuencias de ADN diferentes puede codificar la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o de la cadena pesada del anticuerpo según la invención o fragmentos del mismo (VH, VL, CDR, etc.). La creación de estas secuencias de ADN alternativas que codifican una y la misma secuencia de aminoácidos está dentro de la habilidad de aquellos entrenados en el arte. Tales secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es ADN.

La molécula de ácido nucleico de la invención puede aislarse de cualquier fuente que produzca el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL. En ciertas realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención puede sintetizarse mediante síntesis química, en lugar de aislarse.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos 01_004 y 01_004_2, e incluye la secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos 01_004 y 01_004_2, e incluye la secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 19.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de los anticuerpos 01_004 y 01_004_2, e incluye la secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 20.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 01_004, e incluye la secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 21.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 01_004_2, e incluye la secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 22.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL.

Vector

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriores que codifican las correspondientes secuencias de aminoácidos del anticuerpo que se une específicamente a AXL, o porciones del mismo (por ejemplo, secuencias de dominio de unión a cadena pesada y/o cadena ligera). La presente invención se refiere a un vector adecuado para la expresión de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento.

El término "vector", tal como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos concreta impulsada por su promotor.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, es decir, un fragmento circular de ADN de doble cadena en el que pueden insertarse segmentos adicionales de ADN.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un vector viral (de expresión), en el que pueden insertarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral.

En algunas realizaciones de la invención, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio bacteriano de origen de replicación y vectores episomales). En otras realizaciones de la invención, los vectores (por ejemplo, los vectores no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en una célula huésped, y por tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

En algunas realizaciones de la invención, los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas, como el virus del mosaico de la coliflor, el virus

del mosaico del tabaco, cósmidos, cromosoma artificial de levadura y similares. Las moléculas de ADN pueden insertarse en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traslacional dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y traducción del ADN. Pueden elegirse un vector de expresión y secuencias de control de expresión que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada.

En una realización de la invención, las moléculas de ADN que codifican parcial o totalmente secuencias de cadenas pesadas y ligeras pueden insertarse en vectores distintos.

En una realización, cualquier combinación de las moléculas de ADN anteriores se introduce en el mismo vector de expresión.

En una realización de la invención, las moléculas de ADN pueden introducirse en un vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en un fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes).

En algunas realizaciones de la invención, un vector adecuado es uno que incluye sitios de restricción tales que cualquier secuencia VH o VL puede insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. Un vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de una cadena de anticuerpos a partir de una célula huésped. El gen de una cadena de anticuerpos puede clonarse en un vector de forma que el péptido señal esté unido en el marco al amino terminal de una cadena de inmunoglobulina. Un péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

En algunas realizaciones de la invención, el vector puede incluir una secuencia de control de expresión. El término "secuencia de control de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se insertan. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector de expresión, incluida la selección de las secuencias de control de la expresión, puede depender de factores como la elección del tipo de célula huésped que se va a transformar, el nivel requerido de expresión del anticuerpo, etcétera. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento del ARN, como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control de la expresión difiere en función del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control de la expresión suelen incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma, así como secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control de la expresión suelen incluir promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas para una célula huésped de expresión en un mamífero incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de

proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de un LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/potenciador de CMV), virus simiano 40 (SV40) (como un promotor/ potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío del adenovirus (AdMLP)), poliomavirus y promotores fuertes de mamíferos como el promotor TTR, el promotor nativo de inmunoglobulina o el promotor de actina. Las secuencias de control de expresión abarcan al menos todos los componentes cuya presencia es importante para la expresión y el procesamiento.

En algunas realizaciones de la invención, además de los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias de control de expresión, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido un vector.

Célula huésped

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para producir cualquier anticuerpo anterior o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, e incluye la transformación de la célula con el vector anterior.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para producir cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a AXL, que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores.

El término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La presente invención se refiere a células huésped, que pueden incluir, por ejemplo, el vector descrito anteriormente según la invención. La presente invención se refiere además a células huésped que comprenden, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o porciones de unión al antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera o porciones de unión al antígeno de la misma, o ambas. Debe entenderse que "célula huésped" se refiere no sólo a una célula en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a una célula parental; sin embargo, dichas células siguen estando incluidas en el alcance del término "célula huésped" tal y como se utiliza aquí.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL según la invención y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para la transfección de una célula de mamífero, célula vegetal, célula bacteriana o célula de levadura. La transfección puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la transfección de complejos polímero-ácido nucleico catiónico, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa de ADN en los núcleos.

Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores virales (de expresión).

Las líneas celulares de mamíferos utilizadas como huéspedes para la transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas celulares inmortalizadas disponibles. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células NS0, las células SP2, las células HEK-293T, las células FreeStyle 293 (Invitrogen), las células NIH-3T3, las células HeLa, las células de riñón de hámster bebé (BHK), las células de riñón de mono verde africano (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), las células A549, SK-HEP1, HUH7, las células Hep-RG y otras líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína que se está produciendo. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son las de insectos, como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede aislarse del medio de cultivo utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, Nicotiana, Arabidopsis, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen las especies Escherichia y Streptomyces. Las células huésped de levadura incluyen Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae y Pichia pastoris.

Además, el nivel de producción del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL a partir de una línea celular de producción puede mejorarse utilizando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones.

Es probable que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL a partir de diversas líneas celulares tenga un perfil de glicosilación diferente en entre sí. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL codificado por moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, o que comprenden secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento forman parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión, y, en general, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

La célula huésped anterior no se refiere a una célula huésped producida utilizando embriones humanos.

La célula huésped anterior no se refiere a una célula huésped producida mediante la modificación de la integridad genética de las células de la línea germinal humana.

Método de producción de anticuerpos

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, que comprende cultivar la célula huésped anterior en un medio de crecimiento en condiciones suficientes para producir dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, seguido de aislamiento y purificación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo resultante.

Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende, como principio activo (o como único principio activo), el anticuerpo monoclonal según la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mencionados anteriormente en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica utilizada para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica utilizada para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos anteriores en una cantidad terapéuticamente eficaz en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

"Composición farmacéutica" significa una composición que comprende el anticuerpo según la invención y al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en cargas farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente compatibles, disolventes, diluyentes, portadores, agentes auxiliares, distribuidores y sensores, agentes de administración.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a uno o más componentes líquidos o sólidos compatibles que son adecuados para la administración en un mamífero, preferentemente en un ser humano.

El término "excipiente" se utiliza aquí para describir cualquier ingrediente que no sea el anticuerpo según la presente invención. Son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la producción/fabricación farmacéutica para dar a los medicamentos las propiedades fisicoquímicas necesarias.

En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a mejorar, prevenir o tratar enfermedades o trastornos que pueden estar mediados por AXL.

El término "enfermedad o trastorno mediado por AXL" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que esté directa o indirectamente asociado con AXL, incluida la etiología, el desarrollo, la progresión, la persistencia o la patología de una enfermedad o trastorno.

"Tratar", "tratamiento" y "terapia" se refieren a un método para aliviar o eliminar un trastorno biológico y/o al menos uno de los síntomas que lo acompañan. Además, las referencias al "tratamiento" incluyen referencias al tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

El término "trastorno" significa cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento según la presente invención. La definición del término incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra durante el tratamiento y que aliviará en cierta medida uno o varios de los síntomas de la enfermedad que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función de factores como la afección concreta que se esté tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y de si el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la AXL se está administrando como tratamiento independiente o en combinación con uno o más fármacos o tratamientos adicionales.

En un aspecto, el sujeto del tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos de preparación de las mismas serán sin duda evidentes para los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas deben fabricarse preferentemente de acuerdo con los requisitos de las PCF (prácticas correctas de fabricación).

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, puede incluir una composición tampón, agentes de tonicidad (agente osmolítico u osmótico), estabilizadores y/o solubilizantes.

La composición farmacéutica según la invención es una composición estable.

Una composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante el tiempo de conservación especificado a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de 2-8 °C. Preferiblemente, el agente activo conserva tanto la estabilidad física como la química, así como la actividad biológica. El periodo de almacenamiento se ajusta en función de los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

La composición farmacéutica según la presente invención es adecuada para la administración parenteral como formulaciones estériles destinadas a la administración en un cuerpo sujeto a través de la fisura en la piel o las barreras de la mucosa, sin pasar por el tracto gastrointestinal mediante de la inyección, infusión e implantación. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, entre otras, las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasinovial, transdérmica y de infusión renal dialítica. También puede emplearse la administración intratumoral, por ejemplo, la inyección intratumoral. También se contempla la perfusión regional.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

En algunas realizaciones, la administración intravenosa se lleva a cabo mediante infusión, infusión prolongada o infusión continua de larga duración.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

En algunas realizaciones, la administración subcutánea se lleva a cabo mediante inyección subcutánea.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una forma farmacéutica inyectable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una solución para administración intravenosa.

En algunas realizaciones, la forma farmacéutica inyectable es una solución para infusión.

En algunas realizaciones, la forma farmacéutica inyectable es una solución para administración subcutánea.

Las formulaciones inyectables pueden fabricarse, sin limitación, en forma de dosificación unitaria, como ampollas, viales, recipientes de plástico, jeringas precargadas, dispositivos de autoinyección.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica suministrada en forma seca, es decir, en polvo o granular, para su reconstitución con un disolvente adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su administración. Dicha formulación medicinal puede prepararse, por ejemplo, mediante liofilización, es decir, un proceso conocido en la técnica como secado por congelación, que implica la congelación de un producto seguida de la eliminación del disolvente del material congelado.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un liofilizado para preparar una solución para infusión.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un liofilizado para preparar una solución para administración subcutánea.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un concentrado para preparar una solución para infusión.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un concentrado para preparar una solución para administración subcutánea.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal según la presente invención o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL y al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mencionados anteriormente y al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mencionados anteriormente y, además, al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno anteriores y además al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mencionados anteriormente y al menos otro compuesto terapéuticamente activo, que es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el otro compuesto terapéuticamente activo es un inhibidor del punto de control inmunitario.

El término "inhibidor de punto de control inmunitario" (o "inhibidor de punto de control") se refiere a compuestos que inhiben la actividad de los puntos de control inmunitario. La inhibición incluye la reducción de la función y el bloqueo total. Algunos ejemplos de moléculas inhibidoras de puntos de control son B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, KIR, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, TIGIT, y VISTA. En algunas realizaciones de la invención, el inhibidor de punto de control inmunitario es un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína de punto de control inmunitario. Se conocen varios inhibidores de puntos de control inmunitario y, por analogía con estos inhibidores de proteínas de punto de control inmunitario conocidos, es posible que en un futuro próximo se desarrollen inhibidores de puntos de control inmunitario alternativos. Los inhibidores de puntos de control inmunitario incluyen, entre otros, péptidos, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico y compuestos de bajo peso molecular.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el inhibidor del punto de control inmunitario se selecciona entre un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-1.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-1 se selecciona del grupo: prolgolimab, pembrolizumab, nivolumab.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4 es ipilimumab o nurulimab.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1 se selecciona del grupo: durvalumab, avelumab, atezolizumab, manelimab.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, el otro compuesto terapéuticamente activo se selecciona del grupo: EGFR-TKI, afatinib, erlotinib, gefitinib, osimertinib, doxorrubicina, paclitaxel, capecitabina, carboplatino, cisplatino, lapatinib, trastuzumab emtansina, docetaxel, ciclofosfamida, topotecán, niraprib, olaparib, pembrolizumab, agentes de platino, bevacizumab, prolgolimab, nivolumab, vemurafenib, dabrafenib, cobimetinib, trametinib, etopósido, temozolomida, lomustina, imatinib, dasatinib, vincristina, derivados de doxorrubicina, citarabina, fludarabina, rituximab, venetoclax, inhibidores de PARP, irinotecán, trastuzumab, gemcitabina, atezolizumab, fluoropirimidina,

cetuximab, ipilimumab, metotrexato, ifosfamida, docorrubicina, inhibidores de BRAF, inhibidores de MEK, donepezilo, rivastigmina, galantamina, nintedanib, terapia etiotrópica, terapia antiinflamatoria, glucocorticoide, terapia antitrombótica o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica, la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

Uso terapéutico de un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL

En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL se utiliza en el tratamiento de trastornos mediados por la actividad de AXL.

En un aspecto, el sujeto del tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mencionados anteriormente o dicha composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo mencionados anteriormente y al menos otro compuesto terapéuticamente activo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de

páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el otro compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el otro compuesto terapéuticamente activo es un inhibidor del punto de control inmunitario.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el inhibidor de punto de control inmunitario se selecciona entre un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-1.

En algunas realizaciones de la invención, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-1. Algunos ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a la PD-1 son pembrolizumab, nivolumab, prolgolimab, toripalimab, cemiplimab, sintilimab y otros. Los más preferidos son prolgolimab, pembrolizumab y nivolumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-1 se selecciona del grupo que comprende prolgolimab, pembrolizumab, nivolumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4.

En algunas realizaciones de la invención, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4. Algunos ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a la CTLA4 son ipilimumab, tremelimumab, zalifrelimab, nurulimab y otros. Los más preferidos son ipilimumab o nurulimab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4 es ipilimumab o nurulimab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1.

En algunas realizaciones del método de tratamiento, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1 se selecciona del grupo: durvalumab, avelumab, atezolizumab, manelimab.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo anterior o del fragmento de unión al antígeno del mismo o de la composición farmacéutica anterior para tratar en un sujeto que necesita dicho tratamiento una enfermedad o trastorno mediado por AXL.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo anterior o fragmento de unión a antígeno del mismo y al menos otro compuesto terapéuticamente activo para tratar en un sujeto que necesita dicho tratamiento una enfermedad o trastorno mediado por AXL.

En algunas realizaciones del uso, la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

En algunas realizaciones del uso, el otro compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones del uso, el otro compuesto terapéuticamente activo es un inhibidor de punto de control inmunitario.

En algunas realizaciones del uso, el inhibidor del punto de control inmunitario se selecciona entre un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

En algunas realizaciones del uso, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-1.

En algunas realizaciones del uso, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-1 se selecciona del grupo: prolgolimab, pembrolizumab, nivolumab.

En algunas realizaciones del uso, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4.

En algunas realizaciones del uso, el anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4 es ipilimumab o nurulimab.

En algunas realizaciones del uso, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1.

En algunas realizaciones del uso, el anticuerpo que se une específicamente a la PD-L1 se selecciona del grupo: durvalumab, avelumab, atezolizumab, manelimab.

Los usos o métodos utilizados en el presente documento en relación con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL con uno o más agentes terapéuticos se contemplan para significar, referirse a e incluir lo siguiente:

1) la administración simultánea de dicha combinación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes a dicho paciente sustancialmente al mismo tiempo,

2) la administración simultánea de dicha combinación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan por separado en formas de dosificación independientes que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, con lo cual dichos componentes son liberados a dicho paciente sustancialmente al mismo tiempo,

3) la administración secuencial de dicha combinación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan aparte unos de otros en formas de dosificación separadas que son tomadas en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, con lo que dichos componentes se liberan a dicho paciente en momentos sustancialmente diferentes ; y

4) la administración secuencial de dicha combinación de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL y agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes de manera controlada, con lo cual se liberan concurrente, consecutiva o conjuntamente en el mismo y/o diferentes momentos a dicho paciente, donde cada porción puede administrarse por la misma o diferentes vías.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse sin tratamiento terapéutico adicional, es decir, como terapia independiente.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con agentes EGFR-TKI (afatinib, erlotinib, gefitinib y/u osimertinib) y/o un inhibidor de punto de control inmunitario seleccionado entre un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de PD-L1.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (doxorrubicina, paclitaxel, capecitabina, carboplatino y/o cisplatino) y/o un inhibidor de punto de control inmunitario seleccionado entre un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de PD-L1.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con terapia dirigida (lapatinib) y/o terapia citostática, trastuzumab emtansina.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (docetaxel, paclitaxel, ciclofosfamida y/o topotecán) y/o terapia dirigida (niraprib y/o olaparib).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (docetaxel, paclitaxel, ciclofosfamida y/o topotecán) y/o quimiohormonoterapia combinada y/o terapia dirigida (niraprib y/o olaparib) y/o pembrolizumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (agentes de platino, topotecán y/o paclitaxel) y/o terapia dirigida (bevacizumab) y/o pembrolizumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario (prolgolimab, nivolumab o pembrolizumab) y/o terapia dirigida (vemurafenib/dabrafenib y/o cobimetinib/trametinib).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia citotóxica (agentes de platino, etopósido y/o temozolomida).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (temozolomida, agentes de platino, etopósido y/o lomustina) y/o terapia dirigida (bevacizumab y/o dabrafenib + trametinib) y/o pembrolizumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con inhibidores de tirosina cinasa (imatinib y/o dasatinib).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (vincristina, y/o derivados de doxorrubicina).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (derivados de citarabina y/o doxorrubicina).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioinmunoterapia (fludarabina, ciclofosfamida y/o rituximab) y/o terapia dirigida (venetoclax).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario (pembrolizumab) y/o terapia dirigida (inhibidores de PARP).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (irinotecán y/o docetaxel) y/o un inhibidor de punto de control inmunitario (nivolumab o pembrolizumab) y/o trastuzumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario (nivolumab y/o pembrolizumab).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (cisplatino y/o gemcitabina) y/o un inhibidor de punto de control inmunitario (atezolizumab y/o pembrolizumab).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (fluoropirimidina y/o irinotecán) y/o terapia dirigida (bevacizumab, cetuximab y/o dabrafenib + trametinib) y/o un inhibidor de punto de control inmunitario (pembrolizumab, nivolumab y/o ipilimumab).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (cisplatino y/o gemcitabina) y/o nivolumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (metotrexato y/o ifosfamida).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (vincristina y/o docorrubicina).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con quimioterapia (paclitaxel, cisplatino y/o gemcitabina) y/o pembrolizumab.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario (nivolumab y/o pembrolizumab) y/o trastuzumab y/o terapia dirigida (inhibidores de BRAF/MEK).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con inhibidores de la acetilcolinesterasa central (donepezilo, rivastigmina y/o galantamina).

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL puede administrarse en combinación con nintedanib.

En algunas realizaciones del método de tratamiento o de uso, una dosis adecuada del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a AXL según la presente invención oscilará entre 0,1 y 200 mg/kg.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un mapa genético del vector pIntA_CK_01_004 que contiene la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo anti-AXL 01_004.

La Figura 2 es un mapa genético del vector pIntA_HC_01_004 que contiene la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo anti-AXL 01_004.

Para las figuras 1 a 2

Nombre	**Definición**
Promotor de CMV	Promotor eucariota del citomegalovirus humano
Potenciador de CMV	Secuencia potenciadora del citomegalovirus humano
Intrón A	Sitio aceptor
Kozak	Secuencia de consenso de Kozak para el inicio de la traducción
INICIO	Codón de inicio
IgK líder	Péptido líder de la señal de la IgK murina
VL-01_004	Gen del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-AXL 01_004
CK	Secuencia del dominio constante de la cadena ligera κ del anticuerpo IgG1
VH-01_004	Gen del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-AXL 01_004
HC	Secuencia de los dominios constantes de la cadena pesada HC del anticuerpo IgG1
PARADA	Codón de parada
SV40 PA term	Terminador de transcripción, señal de poliadenilación del virus SV40
VEB ori	Lugar de origen de la replicación del virus de Epstein-Barr
AmpR	Gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina. Permite la selección de cultivos celulares de *E.coli*
pUCorigen	Origen bacteriano de replicación de alto número de copias

La Figura 3 es un electroforegrama del candidato 01_004 obtenido mediante electroforesis en gel vertical en condiciones desnaturalizantes no reductoras en PAAG al 8%.

1 - solución tampón para la aplicación de muestras, libre de 2-mercaptetanol;

2 - marcadores moleculares de proteínas; los pesos moleculares correspondientes a los carriles (kDa) se muestran a la izquierda de los electroforegramas;

3 - 01_004, carga de 10 μg;

4 - 01_004, carga de 0,1 μg.

La Figura 4 es un electroforegrama del candidato 01_004 obtenido mediante electroforesis en gel vertical en condiciones desnaturalizantes reductoras en PAAG al 12,5%.

1 - solución tampón para la aplicación de muestras, que comprende 2-mercaptetanol;

2 - marcadores moleculares de proteínas; los pesos moleculares correspondientes a los carriles (kDa) se muestran a la izquierda de los electroforegramas;

3 - 01_004, carga de 10 μg;

4 - 01_004, carga de 0,1 μg.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra los resultados de ELISA para medir la unión de anticuerpos anti-AXL a distintos fragmentos extracelulares de AXL.

10G5 - anticuerpo anti-AXL de control del dominio AXL-Ig1

Control - control sin introducir anticuerpos anti-AXL

La Figura 6 es un gráfico que ilustra la actividad inhibidora de los anticuerpos anti-AXL en un ensayo que utiliza una línea celular informadora.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra los resultados de ELISA para medir la inhibición de la fosforilación de AXL dependiente de GAS6 por el anticuerpo anti-AXL.

blanco - control sin introducir lisado celular, nivel de fondo de DO en ELISA

Control pAXL - producto de control AXL fosforilado del kit DuoSet IC ELISA intracelular Human Phospho-Axl (R&D Systems)

células no estimuladas - células incubadas en ausencia de GAS6 y anticuerpos

GAS6 - células incubadas en presencia de GAS6

Control negativo IgG1 - células incubadas en presencia de un anticuerpo IgG1 de control (no anti-AXL)

01_004 - células incubadas en presencia del anticuerpo 01_004

01_004 + GAS6 - células incubadas en presencia de GAS6 y del anticuerpo 01_004

IgG1 + GAS6 control negativo - células incubadas en presencia de GAS6 y un anticuerpo IgG1 de control (no anti-AXL)

La Figura 8 es un gráfico que ilustra la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en un ensayo que utiliza una línea celular informadora.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en un ensayo con PBMC.

La Figura 10 es un gráfico que ilustra la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) en un ensayo que utiliza una línea celular informadora.

La Figura 11 es un gráfico que ilustra la unión dosis-dependiente de anticuerpos anti-AXL a AXL humana y de cynomolgus.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra los volúmenes tumorales frente al tiempo tras el inicio de la administración de fármacos anti-AXL a ratones durante un estudio *in vivo* en un modelo de xenoinjerto subcutáneo.

Nota: * p <0,05, diferencia estadísticamente significativa respecto al control (prueba de Mann-Whitney).

La Figura 13 es un gráfico que ilustra el cambio en la concentración de los productos candidatos anti-AXL en el suero sanguíneo de monos tras la administración intravenosa repetida.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Materiales y métodos generales

La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se encuentra en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos están numerados según el esquema de numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante.

Síntesis genética

Los segmentos genéticos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados por síntesis química. Los segmentos génicos de 300 a 1400 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción singulares, se ensamblaron mediante el recocido y la ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción. Las secuencias de ADN de los fragmentos genéticos subclonados se confirmaron mediante la secuenciación del ADN.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger.

Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias

Para la creación de la secuencia, el mapeo, el análisis, la anotación y la ilustración se utilizó el paquete UGENE versión 1.29 de Unipro y SnapGene versión 6.1.

Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos descritos en los materiales de la solicitud, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión destinados a la expresión de anticuerpos en células procariotas *(E.coli)*, expresión transitoria en células eucariotas (por ejemplo, en células CHO). Además del casete de expresión de anticuerpos, los vectores contenían: un origen de replicación que permite la replicación de dicho plásmido en *E. coli*, genes que confieren resistencia en *E. coli* a diversos antibióticos (por ejemplo, a la ampicilina, la kanamicina).

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas a continuación se generaron mediante PCR y/o síntesis genética y se ensamblaron con métodos y técnicas recombinantes

conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN. Para las transfecciones transitorias, se prepararon mayores cantidades de plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados.

Ejemplo 1. Diseño y creación de constructos genéticos para la síntesis de anticuerpos monoespecíficos anti-AXL de longitud completa.

Se produjeron anticuerpos monoespecíficos anti-AXL en formato IgG1 bivalente de longitud completa. En la secuencia de la porción Fc de la cadena pesada de los anticuerpos anti-AXL, se eliminaron dos aminoácidos C-terminales GK. La eliminación de dos aminoácidos C-terminales GK en la secuencia de la porción Fc de la cadena pesada da como resultado una mayor productividad y homogeneidad del producto anticuerpo generado en células CHO, un perfil ácido-base (PAB) mejorado del mismo, en el que dicha eliminación no afecta a la farmacocinética, actividad y estabilidad del anticuerpo.

Los anticuerpos 01-004 y 01-004_2 tienen los mismos dominios variables de la cadena ligera y pesada. El anticuerpo 01-004_2 comprende, en la porción Fc de la cadena pesada, sustituciones adicionales de aminoácidos S239D e I332E (según la numeración de la UE).

Las construcciones genéticas se crearon de la siguiente manera. Se generaron productos PCR que comprendían secuencias de dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos utilizando cebadores PCR que comprendían secuencias adicionales complementarias a los sitios respectivos de los vectores de expresión pIntA respectivos. El procedimiento de ensamblaje descrito a continuación se llevó a cabo mediante un método independiente de ligadura utilizando la actividad exonucleasa 3'-5' de la ADN polimerasa Pfu Ultra II. La secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena ligera (VL) se insertó en el vector pIntA_CK utilizando sitios de restricción SapI. El vector pIntA_CK_01_004 (Figura 1) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la porción constante de la cadena kappa ligera del anticuerpo IgG1. La secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena pesada (VH) se insertó en el vector pIntA_HC utilizando sitios de restricción SapI. El vector pIntA_HC_01_004 (Figura 2) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la porción constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG1 que comprende una deleción de los aminoácidos C-terminales GK. En el caso del anticuerpo 01-004_2, en la secuencia de nucleótidos de la porción constante de la cadena pesada se han introducido además sustituciones de nucleótidos que proporcionan las sustituciones de aminoácidos S239D e I332E.

Las secuencias nucleotídicas de las construcciones plasmídicas resultantes se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los plásmidos resultantes se generaron en las cantidades deseadas en células *E.coli* y se purificaron utilizando un kit de aislamiento de ADN plasmídico. A continuación, los plásmidos se utilizaron para producir transitoriamente proteínas en la línea celular CHO-K1-S.

Ejemplo 2. Generación, aislamiento y purificación de anticuerpos monoclonales

Para generar anticuerpos en el sistema de expresión transitoria se utilizaron células de la línea CHO-K1-S. Para la generación, se utilizó un medio de cultivo de células CHO suplementado además con 4 mM

de glutamina, 10 μg/ml de gentamicina, 10 μg/ml de ciprofloxacino y 100 μM de desoxi-2-fluoro-L-fucosa. Las células se cultivaron en matraces con deflectores en incubadoras-agitadores orbitales a +37 °C en presencia de un 5% deCO_2 mientras se agitaban constantemente.

Para la expresión transitoria, se transfectó un cultivo celular a 1,8-2·10^6 células/ml utilizando polietilenimina lineal. La relación ADN/PEI era de 1:7. El séptimo día de cultivo, la suspensión celular se clarificó por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm.

El día 7 tras la transfección, se tomaron muestras de fluido celular y se midió en ellas la concentración de la proteína generada mediante interferometría de bicapa en el instrumento OctetRed 96 (ForteBio) sobre chips Protein-A Biosense siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 1).

Tabla 1. Productividad de los anticuerpos contra AXL

Anticuerpo	**Productividad proteica, mg/l**
01_004	304
01_004_2	157

Mientras se generaban transitoriamente, los anticuerpos 01_004 y 01_004_2 demostraron la productividad típica de los anticuerpos monoclonales.

La purificación del anticuerpo se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando un sorbente a base de sefarosa con proteína A inmovilizada. Cuando fue necesario, se realizó una purificación cromatográfica adicional del producto en el sorbente cerámico de hidroxiapatita de tipo I. La calidad de los anticuerpos resultantes se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (en presencia de dodecil sulfato sódico) en condiciones no reductoras (sin adición de mercaptoetanol) y reductoras (con adición de mercaptoetanol) (Figuras 3-4).

Ejemplo 3. Producción de construcciones genéticas para sintetizar antígenos. Generación, aislamiento y purificación de antígenos

Para obtener diversos fragmentos del receptor AXL, se crearon varias construcciones genéticas que codifican varios dominios AXL humanos o de cynomolgus. Los plásmidos de expresión para generar proteínas antigénicas en células CHO se basan en vectores pEE o pIntA y comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los respectivos fragmentos de receptores AXL fusionados, para la conveniencia de la purificación posterior de las proteínas generadas, a la etiqueta His6 o a la etiqueta basada en la porción Fc del anticuerpo Ig1. Las construcciones genéticas se produjeron mediante técnicas convencionales de ingeniería genética.

Los datos sobre la secuencia de aminoácidos de la AXL humana se obtuvieron de la base de datos NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA61243.1?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RI

D=SV8VAB28013). La secuencia de la porción extracelular de AXL humana (417AA) está representada por SEQ ID NO: 23.

Se obtuvieron los siguientes antígenos:

ExcAXL - un fragmento de receptor AXL humano, que comprende todos los dominios extracelulares AXL, fusionado a His-tag (SEQ ID NO: 24).

AXL-Ig1 - un fragmento de receptor AXL humano, que comprende la secuencia del dominio extracelular 1 de tipo C2 similar a Ig de AXL, fusionado mediante un enlazador a IgG1 Fc (SEQ ID NO: 25).

AXL-Ig2 - un fragmento de receptor AXL humano, que comprende la secuencia del dominio extracelular 2 de tipo C2 similar a Ig de AXL, fusionado mediante un enlazador a IgG1 Fc (SEQ ID NO: 26).

AXL-Ig1-Ig2 - un fragmento de receptor AXL humano, que comprende las secuencias de los dominios extracelulares 1 y 2 de tipo C2 similar a Ig de AXL, fusionados mediante un enlazador a IgG1 Fc (SEQ ID NO: 27).

El gen que codifica la AXL del macaco Cynomolgus(*Macaca fascicularis*) se amplificó a partir de un producto de ADNc derivado del ARN del músculo liso del macaco Cynomolgus. A continuación, se determinó la secuencia del gen mediante secuenciación. La secuencia de la porción extracelular de AXL de Cynomolgus obtenida de este modo se utilizó para crear una construcción de plásmido de expresión respectiva.

cynoAXL - un fragmento del receptor AXL del macaco cynomolgus, que comprende secuencias de todos los dominios extracelulares del receptor AXL del macaco, fusionado mediante un enlazador a las etiquetas His6- y FLAG (SEQ ID NO: 28).

Las secuencias nucleotídicas de las construcciones plasmídicas resultantes se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los plásmidos resultantes se generaron en las cantidades deseadas en células *E.coli* y se purificaron utilizando un kit de aislamiento de ADN plasmídico. A continuación, los plásmidos se utilizaron para producir transitoriamente proteínas en la línea celular CHO-K1-S.

Para generar antígenos en el sistema de expresión transitoria se utilizaron células de la línea CHO-K1. Las células se cultivaron en matraces con deflectores en incubadoras-agitadores orbitales a +37 °C en presencia de un 5% deCO_2 mientras se agitaban constantemente.

Para la expresión transitoria, se transfectó un cultivo celular a 1,8-2·10^6 células/ml utilizando polietilenimina lineal. La relación ADN/PEI era de 1:7. El séptimo día de cultivo, la suspensión celular se clarificó por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm.

Los antígenos que comprenden Fc-tag se purificaron de forma similar a los anticuerpos en un sorbente de afinidad de proteína A (véase el ejemplo 2).

Los antígenos que contienen la etiqueta Fc se purificaron mediante cromatografía de afinidad en un sorbente con proteína A inmovilizada. Los antígenos que contienen la etiqueta HIS6 se purificaron mediante cromatografía de quelatos metálicos en un sorbente cargado con Ni. La calidad de los antígenos resultantes se analizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante de gradiente 4-

15% en condiciones no reductoras o reductoras. El análisis de la calidad adecuada de los antígenos obtenidos se confirmó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante con gradiente del 4-15% en condiciones no reductoras sin adición de mercaptoetanol y en condiciones reductoras con adición de mercaptoetanol.

Ejemplo 4. Prueba para evaluar la unión de anticuerpos anti-AXL a dominios AXL humanos mediante ELISA.

Los antígenos (ExcAXL, AXL-Ig1, AXL-Ig2, AXL-Ig1-Ig2) se inmovilizaron en pocillos de una placa de 96 pocillos de alta absorción. Para ello, en los pocillos de la placa se introdujeron 100 µl de solución de antígeno a una concentración de 1 µg/ml en PBS; la placa se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente.

A continuación, se retiró el líquido de los pocillos, se lavaron con 300 µl de solución tampón de lavado (1x PBS pH 7,3-7,5, 0,05% Tween-20) y se añadieron 300 µl/pocillo de solución tampón de bloqueo (1x PBS con 1% BSA). La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a eliminar el líquido y se lavó la placa. A continuación, se introdujeron en los pocillos de la placa 100 µl de anticuerpos de prueba a una concentración de 1 µg/ml en un tampón de dilución (1x PBS con 0,1% de BSA, 0,05% de Tween-20). A continuación, la placa se incubó con anticuerpos en un agitador térmico durante 1 hora a 37 °C, 600 rpm. Tras la incubación, se eliminó el líquido, se lavó la placa y se añadieron 100 µl de anticuerpos Fab-HRP antihumanos en un tampón de dilución. Después de la incubación en un agitador térmico a 37 °C y 600 rpm, la placa se lavó durante una hora y se añadieron 100 µl de sustrato de reacción (0,083 mg/ml de TMB, H_2O_2 al 0,02 %) en una solución tampón de acetato (0,05 M, pH 5,5) fue añadido. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl deH_2SO_4 al 10% a cada pocillo de la placa. Los valores de densidad óptica se midieron a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 540 nm mediante un lector de placas.

Los resultados de ELISA (Figura 5) muestran que el anticuerpo anti-AXL reproducido 10G5 se une a fragmentos de AXL, que comprenden un dominio 1 del tipo C2 similar a Ig distinto de AXL (AXL-Ig1) o dominios 1 de tipo C2 similar a Ig y dominio 1 de tipo C2 similar a Ig (AXL-Ig1-Ig2), y a la porción extracelular completa de AXL (ExcAXL), pero no se une a fragmentos de AXL que comprenden un dominio 2 del tipo C2 similar a Ig distinto de AXL (AXL-Ig2). Los anticuerpos anti-AXL 01_004 y 01_004_2 se unen a fragmentos de AXL, que comprenden un dominio 2 del tipo C2 similar a Ig distinto de AXL (AXL-Ig2) o dominio 1 de tipo C2 similar a Ig y dominio 1 de tipo C2 similar a Ig (AXL-Ig1-Ig2), y a la porción extracelular completa de AXL (ExcAXL) pero no se unen a fragmentos de AXL que comprenden un dominio 1 de tipo C2 similar a Ig distinto (AXL-Ig1).

Ejemplo 5. Prueba para determinar la actividad de bloqueo de los anticuerpos anti-AXL utilizando una línea celular reportera.

En la prueba se utilizó una línea celular reportera derivada de células HEK293, que expresaba AXL de forma estable en superficie y que comprendía un gen que codificaba la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor STAT3-STAT5-AP1.

El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos diseñada para ensayos de luminiscencia. La suspensión contenía por pocillo 30.000 células de la línea celular reportera, anticuerpo de prueba a una concentración como la indicada en el gráfico en presencia o ausencia de Gas6. El volumen final de la suspensión celular en un pocillo fue de 100 µl, todos los componentes de la suspensión se prepararon en medio DMEM libre de suero bovino fetal. Tras añadir todos los componentes, la placa se incubó durante 16 horas a 37°C, 5% de CO_2; a continuación, utilizando un kit de ensayo de luminiscencia, se midió la intensidad de luminiscencia en los pocillos. La medición se realizó con un lector de placas.

Los resultados del ensayo (Figura 6) muestran que el anticuerpo anti-AXL 01_004 induce la supresión de la activación de la señalización intracelular de AXL dependiente de GAS6.

Ejemplo 6. Prueba para evaluar la inhibición de la fosforilación de AXL dependiente de GAS6.

La fosforilación de AXL se evaluó mediante ELISA. Se introdujo una suspensión de células H1299 en un volumen de 3 ml en una placa de fondo plano de 6 pocillos a una dosis de siembra de 1×10^4 células/cm^2 en un medio de crecimiento completo (DMEM/F12, 2 mM L-glutamina, 10% FBS HI), la placa se incubó durante 24 horas a 37°C, 5%CO_2. Tras la incubación, se retiró el medio de crecimiento de los pocillos y se introdujo un medio libre de suero (DMEM/F12, 2 mM L-glutamina) a razón de 2 ml/pocillo; los pocillos se incubaron durante toda la noche a 37°C, 5%CO_2. Tras la incubación, se sustituyó el medio libre de suero por uno fresco a 2 ml/pocillo, se añadieron 500 ml/pocillo de 01_004 o anticuerpo IgG1 de control a una concentración de 500 µg/ml en dos réplicas (se añadió un volumen equivalente de medio libre de suero a los pocillos sin anticuerpos), se incubaron los pocillos durante una hora a 37°C, 5%CO_2. Tras la incubación, se añadieron 500 µl de GAS6 a una de las réplicas de cada muestra a una concentración de 3 µg/ml, 500 µl de medio libre de suero a la otra, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C, 5%CO_2. Tras la incubación, se retiró el medio de los pocillos de la placa y el monocapa celular se lavó dos veces con PBS helado a 2 ml/pocillo, se introdujeron 300 µl/pocillo de un tampón de lisado con inhibidores de la fosfatasa y la proteasa, y la placa se incubó en hielo durante 45 minutos. La concentración de proteína total en las muestras se determinó mediante el ensayo BCA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se almacenaron a -80°C.

A continuación, se realizó un ELISA utilizando un kit comercial, DuoSet IC ELISA intracelular Human Phospho-Axl, (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de introducirlos en los pocillos de la placa experimental, los lisados celulares se diluyeron a una concentración de 300 µg/ml.

Los resultados del ensayo (Figura 7) muestran que el anticuerpo anti-AXL 01_004 induce la supresión de la fosforilación de AXL dependiente de GAS6.

Ejemplo 7. Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) utilizando una línea celular reportera.

El ensayo utilizó una línea celular reportera Jurkat-NFAT-Luc-CD16 creada a partir de la línea celular Jurkat, que expresa CD16 de forma estable en la superficie y contiene un gen que codifica la luciferasa de luciérnaga, bajo el control del promotor NFAT; la línea que expresa AXL, NCI-H1299, se

utilizó como células diana. Las células Jurkat-NFAT-Luc-CD16 y NCI-H1299 se cultivaron a 37°C con un 5% deCO_2 en medio nutritivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal.

El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos diseñada para ensayos de luminiscencia. Cada pocillo con suspensión contenía 25.000 células efectoras Jurkat-NFAT-Luc-CD16, 25.000 células diana NCI-H1299 que expresaban AXL, así como anticuerpos de prueba a una concentración según se indica en el gráfico. El volumen final de la suspensión de células y anticuerpos en un pocillo fue de 100 µl; todos los componentes de la suspensión se prepararon en medio RPMI-1640 con un 10% de FBS. Después de añadir todos los componentes, las placas se incubaron durante 16 horas a 37°C, 5%CO_2; a continuación, utilizando un kit de ensayo de luminiscencia, se midió la intensidad de luminiscencia en los pocillos. La medición se realizó con un lector de placas.

Los resultados de las pruebas (Figura 8) muestran que los anticuerpos anti-AXL 01_004 y 01_004_2 tienen actividad ADCC.

Ejemplo 8. Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) utilizando PBMC.

Las PBMC se aislaron de sangre total de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Las células A549 se cultivaron a 37°C con un 5% deCO_2 en un medio nutritivo DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal.

El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos. La suspensión contenía por pocillo 30.000 células diana A549 que expresaban AXL, 300.000 PBMC recién aisladas, así como anticuerpos de prueba a la concentración especificada. El volumen final de la suspensión celular en un pocillo era de 150 ml; todos los componentes se prepararon en medio RPMI-1640 con un 10% de suero bovino fetal. La placa se incubó durante 16 horas a 37°C con un 5% de CO_2. Al final de la incubación, a los pocillos de control que sólo contenían células diana se añadió solución de lisis 10x (CytoTox96® Non-Radio Cytotoxicity Assay, Promega) a concentración 1x, la placa se incubó a 37°C en un incubador de CO_2 durante 30 minutos. El sobrenadante de todos los pocillos se transfirió a una placa en forma de V, se centrifugó a 300 g y se tomaron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo en nuevas placas. Se mezclaron el tampón de ensayo y la mezcla de sustrato (kit CytoTox96® Non-Radio Cytotoxicity Assay) y se añadieron 15 µl a los pocillos que contenían sobrenadante. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante un máximo de 30 minutos. Se añadieron 15 ml de solución de parada (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, Promega) a cada pocillo. La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 490 nm utilizando un lector de placas.

Los resultados del ensayo (Figura 9) muestran que los anticuerpos anti-AXL 01_004 y 01_004_2 tienen actividad ADCC.

Ejemplo 9. Ensayo para determinar la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) utilizando una línea celular reportera.

En el ensayo se utilizó la línea celular reportera Jurkat-NFAT-Luc-CD64 creada a partir de la línea celular Jurkat, que expresa CD64 de forma estable en superficie y contiene un gen que codifica la luciferasa de luciérnaga, bajo el control del promotor NFAT; como células diana se utilizó la línea celular A549. Las

células Jurkat-NFAT-Luc-CD64 y A549 se cultivaron a 37°C con un 5% deCO_2 en un medio de crecimiento apropiado suplementado con un 10% de suero bovino fetal, las células Jurkat-NFAT-Luc-CD64 se cultivaron en medio RPMI-1640, las células A549 se cultivaron en medio DMEM.

El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos diseñada para ensayos de luminiscencia. La suspensión contenía por pocillo 30.000 células de la línea reportera Jurkat-NFAT-Luc-CD64 y 30.000 células diana A549, así como anticuerpos de prueba a la concentración especificada. El volumen final de suspensión por pocillo fue de 100 µl, todos los componentes de la suspensión se prepararon en medio RPMI-1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal. Tras añadir todos los componentes, la suspensión se incubó durante 16 horas a 37°C, 5% CO_2; a continuación, utilizando un kit comercial de ensayo de luminiscencia, se midió la intensidad de la luciferasa en los pocillos. La medición se realizó con un lector de placas.

Los resultados del ensayo (Figura 10) muestran que los anticuerpos anti-AXL 01_004 y 01_004_2 inducen la activación de la señalización NFAT dependiente de CD64 que media la ADCP.

Ejemplo 10. Ensayo de unión anticuerpo-antígeno anti-AXL mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Los antígenos (human_AXL y cynoAXL) se inmovilizaron en pocillos de una placa de 96 pocillos de alta absorción. Para ello, se introdujeron en los pocillos de la placa 100 µl de solución de antígeno a una concentración de 1 µg/ml en tampón carbonato (0,1M $NaHCO_3$, pH 9,5); la placa se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente.

A continuación, se retiró el líquido de los pocillos, se lavaron con 300 µl de solución tampón de lavado (1x PBS pH 7,3-7,5, 0,05% Tween-20) y se añadieron 300 µl/pocillo de solución tampón de bloqueo (1x PBS con 1% BSA). La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a eliminar el líquido y se lavó la placa. A continuación, se añadieron a los pocillos de la placa 100 µl del anticuerpo 01_004_2, a una concentración como la indicada en el gráfico, en tampón de dilución (1x PBS con 0,1% de BSA, 0,05% de Tween-20). A continuación, la placa se incubó con anticuerpos en un agitador térmico durante 1 hora a 37 °C, 600 rpm. Tras la incubación, se eliminó el líquido, se lavó la placa y se añadieron 100 µl de anticuerpos Fab-HRP antihumanos en un tampón de dilución. Después de la incubación en un agitador térmico a 37 °C y 600 rpm, la placa se lavó durante una hora y se añadieron 100 µl de sustrato de reacción (0,083 mg/ml de TMB, H_2O_2 al 0,02 %) en una solución tampón de acetato (0,05 M, pH 5,5) fue añadido. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl deH_2SO_4 al 10% a cada pocillo de la placa. Los valores de densidad óptica se midieron a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 540 nm mediante un lector de placas.

Los resultados del ensayo (Figura 11) muestran que el anticuerpo anti-AXL 01_004_2 se une a la AXL humana y a la AXL de cynomolgus.

Ejemplo 11. Determinación de la estabilidad de agregación de anticuerpos anti-AXL tras estrés térmico.

La estabilidad de agregación de los anticuerpos anti-AXL se comprobó mediante estrés térmico (50°C, 48 h). La proporción de monómero en las muestras antes y después del estrés térmico se determinó mediante HPLC de exclusión por tamaño.

Las muestras de ensayo se termostatizaron a 50°C durante 72 horas. Tras el calentamiento, las muestras intactas y estresadas, clarificadas por centrifugación, se transfirieron para su análisis por HPLC de exclusión por tamaño (HPLC SEC) con detector UV y por el método de enfoque isoeléctrico capilar. La cromatografía se realizó en un sistema HPLC Agilent 1100 con una columna TSK-Gel G3000SWXL de Tosoh; la detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm.

Tabla 2. Estabilidad de agregación de los anticuerpos anti-AXL

Anticuerpo	**Contenido de monómero antes del estrés térmico, %±SD**	**Contenido de monómero tras el estrés térmico, %±SD**
01_004	98,17±0,06	97,9±0,1
01_004_2	97,3±0,7	94,6±0,4

Conclusión: los anticuerpos contra AXL según la invención tienen una alta estabilidad de agregación.

Ejemplo 12. Determinación de la estabilidad fisicoquímica de anticuerpos anti-AXL en suero sanguíneo humano

Se realizó un estudio comparativo de la estabilidad de los anticuerpos anti-AXL 01_004 y 01_004_2 en suero sanguíneo humano y de ratón. Se obtuvo suero sanguíneo combinado de 7 donantes sanos y 7 ratones exogámicos sanos, mezclados en proporciones iguales por volumen. Los anticuerpos de prueba se añadieron al suero con mertiolato sódico al 0,1% hasta una concentración de 25 µg/ml y se incubaron durante 14 días a una temperatura de 37°C. A continuación, se determinó la concentración de anticuerpos anti-AXL mediante enzimoinmunoanálisis en suero humano y de ratón antes y después de la incubación durante 14 días a 37°C, y se calculó el % de estabilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de estabilidad de los anticuerpos anti-AXL.

	Estabilidad, %.	
Anticuerpo	**suero humano**	**suero de ratón**
01_004_2	100	72
01_004	89	61

La concentración detectable del anticuerpo anti-AXL tras su almacenamiento en suero humano a +37°C durante 14 días a una concentración de 25 µg/ml corresponde a una alta estabilidad. Se considera que la estabilidad normal de los anticuerpos monoclonales en el suero humano es del 60%.

Ejemplo 13. Determinación de las constantes de unión del anticuerpo 01_004 a diversos antígenos.

Las constantes de unión del anticuerpo 01_004 a varios antígenos se determinaron mediante SPR (resonancia de plasmón de superficie) utilizando Biacore 8K (Cytiva). El antígeno de prueba se inmovilizó en el Sensor Chip CM5 (Cytiva), seguido de un análisis de su unión al anticuerpo anti-AXL 01_004 en PBS 0,02% Tween-20 pH 7,4. Los datos de las mediciones se procesaron con el software Biacore Insight Evaluation (Cytiva).

Los valores medios de las constantes de equilibrio de unión se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes de equilibrio de unión del anticuerpo 01_004 a varios antígenos

	Resultados	KD (M)
1	AXL humano	4,30E-11
2	cynomolgus (Macaca fascicularis) AXL	5,28E-11
3	rhesus (Macaca mulatta) AXL	1,05E-10
4	ratón (Mus musculus) AXL	no se ha detectado ninguna unión
5	rata (Rattus norvegicus) AXL	no se ha detectado ninguna unión
6	conejo (Oryctolagus cuniculus) AXL	2,40E-7
7	TYRO3	no se ha detectado ninguna unión
8	MERTK	no se ha detectado ninguna unión

Conclusión: el anticuerpo contra AXL según la invención se une específicamente al antígeno AXL humano, así como al antígeno AXL de mono, pero no se une a otros antígenos probados estrechamente relacionados.

Ejemplo 14. Determinación de la actividad antitumoral de productos anti-AXL utilizando un modelo de xenoinjerto subcutáneo

La actividad antitumoral de los productos se midió utilizando un modelo de xenoinjerto tumoral subcutáneo. Para ello, se transplantaron por vía subcutánea ratones BALB/c Nude hembra con 5×10^6 células tumorales de la línea A549 mezcladas con Matrigel® en proporción 1:1. Tras alcanzar un volumen tumoral medio de 95,6±1 mm^3, los ratones se dividieron en 3 grupos de 9 ratones cada uno, de modo que los volúmenes tumorales medios entre los grupos fueran comparables.

01-004, 01-004_2 se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. El grupo de control negativo se inyectó con una solución tampón de productos anti-AXL de modo similar.

Durante el experimento, se determinaron las dimensiones lineales del tumor. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula $V=L\times W\times H\times\pi/6$, donde L y W son los diámetros grande y pequeño del tumor, respectivamente, y H es la altura del tumor.

La eficacia del producto de ensayo se midió mediante el índice de inhibición del crecimiento tumoral (ICT) calculado según la siguiente fórmula:

ICT (%) = $(V_c-V_p)/V_c\times100$,

donde V_c y V_p son los volúmenes tumorales medios en el grupo de control negativo y en el grupo de animales que reciben el producto de ensayo, respectivamente. Cuanto mayor sea el valor del índice, más pronunciado será el efecto antitumoral.

El día 32 del experimento, se practicó la eutanasia a los animales, se extrajeron los tumores y se pesaron utilizando balanzas analíticas.

La figura 12 muestra la dinámica del volumen tumoral.

En el momento del inicio de la administración del producto, el volumen tumoral no difería significativamente entre los grupos. En el grupo de animales que recibieron el producto 01_004_2, el día 25 del experimento, el volumen tumoral era significativamente menor que en el grupo de control. En el caso de la administración repetida del producto 01_004, el volumen tumoral fue significativamente inferior al del grupo de control desde el día 21 hasta el día 32 del experimento.

El índice ICT en el día 32 del experimento fue el siguiente 35% para el grupo de productos 01_004_2, 43% para el grupo de productos 01_004.

La tabla 5 muestra los valores medios de las masas tumorales al final del experimento.

Tabla 5. Masas tumorales el día 32 del experimento

Producto	**Masa, media (mg)**
01_004_2	349
01_004	326
Placebo	624

Hubo una tendencia a la disminución de este parámetro en los grupos experimentales en comparación con el control.

Ejemplo 15. Determinación de la toxicidad y del efecto irritante local de los productos anti-AXL en caso de administración intravenosa repetida a monos cynomolgus *(Macaca fascicularis)* durante 4 semanas.

Se midió la toxicidad y el efecto irritante local en monos cynomolgus. Los productos 01_004_2 y 01_004 se administraron por vía intravenosa a una dosis de 20 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas.

En el transcurso del experimento, se controló el peso corporal, la actividad motora, las reacciones vegetativas, el estado del pelaje, los cambios oculares (estado de la fisura palpebral/conjuntiva/esclerótica), el estado de las mucosas de las cavidades oral y nasal, los parámetros de las heces, el apetito, los parámetros de la respiración, el estado funcional del sistema excretor; se analizó la composición celular de la sangre periférica, se evaluó el estado del sistema de coagulación, la función proteínica, de los hidratos de carbono y enzimática del hígado (parámetros bioquímicos del suero sanguíneo: actividad de las enzimas indicadoras, bilirrubina total, colesterol, proteínas totales, triglicéridos, glucosa), estado del sistema urinario según los

resultados de los análisis bioquímicos del suero animal (según el nivel de urea, creatinina, iones de sodio y potasio y los resultados de los análisis de orina), realizamos un examen patomorfológico de los órganos internos. El efecto irritante local se evaluó según el examen visual y el estudio histológico del lugar de administración de los productos y de los ganglios linfáticos drenantes.

Los resultados del experimento mostraron que la administración de los productos 01_004_2 y 01_004 fue bien tolerada por los animales. Durante todo el período de observación, no se observaron cambios en las reacciones vegetativas, el estado del pelaje, los ojos (conjuntiva, esclerótica, lagrimeo, secreción), las mucosas de las cavidades nasal y oral; las heces, la respiración, la disminución de los parámetros del apetito y en el comportamiento de los animales.

Los productos 01_004_2 y 01_004 no tuvieron ningún efecto sobre el peso corporal, el sistema de coagulación, los parámetros hematológicos, las proteínas, los hidratos de carbono y las funciones enzimáticas hepáticas, así como sobre el sistema urinario de los monos cynomolgus.

Los resultados de los exámenes patomorfológicos no muestran anomalías en la estructura de los órganos y tejidos de los animales de experimentación asociadas a la administración de los productos de ensayo.

Tras la administración intravenosa repetida durante 4 semanas a una dosis de 20 mg/kg, los productos 01_004_2 y 01_004 no tuvieron un efecto irritante local.

Los datos resultantes muestran que, tras la administración intravenosa repetida durante 4 semanas, a una dosis de 20 mg/kg los productos 01_004_2 y 01_004 no tuvieron ningún efecto sobre los principales órganos y sistemas orgánicos de los monos cynomolgus*(Macaca fascicularis*).

Ejemplo 16. Determinación de la farmacocinética de productos anti-AXL tras su administración intravenosa repetida a monos cynomolgus (Macaca fascicularis)

Este estudio se realizó como parte del análisis de la toxicidad de los productos anti-AXL en primates (véase el ejemplo 15).

Para evaluar los parámetros farmacocinéticos, se recogió sangre de todos los animales inmediatamente antes de la primera administración del producto 01_004_2 o del producto 01_004 (antecedentes), y después en los puntos temporales de 0, 25, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 120 168 h después de la primera administración del producto 01_004_2 o 01_004, así como inmediatamente antes de la 4ta. administración del producto (504 horas) y en los momentos 504, 25, 506, 508, 512, 528, 552, 576, 624, 672 h después de la 4ta. administración del producto.

La concentración de anticuerpos en el suero sanguíneo se midió mediante enzimoinmunoanálisis en fase sólida (ELISA) utilizando peroxidasa de rábano picante como enzima indicadora. Para determinar la concentración de anticuerpos anti-AXL en las muestras, se utilizaron soluciones de los anticuerpos anti-AXL correspondientes con una concentración conocida para construir una curva de calibración.

La figura 13 muestra las curvas medias de los cambios en las concentraciones de los anticuerpos 01_004_2 y 01_004 a lo largo del tiempo en el suero sanguíneo de los monos. Los resultados mostraron que tras la administración intravenosa repetida de productos de anticuerpos anti-AXL a una dosis de 20

mg/kg, los valores medios de los parámetros PK son típicos de los anticuerpos monoclonales terapéuticos. Además, los datos resultantes muestran la presencia de acumulación de anticuerpos de prueba.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, que comprende:

(a) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y

CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende:

CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,

CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y

CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

2. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

3. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

4. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que:

(a) el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y

(b) el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

5. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo que se une específicamente a AXL es un anticuerpo IgG de longitud completa.

6. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo IgG de longitud completa es de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano.

7. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende las mutaciones S239D e I332E según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

8. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende la deleción 446G y 447K según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos en la región CH3.

9. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

10. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

11. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende:

(i) (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o

(ii) a) una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

12. El ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. El ácido nucleico según la reivindicación 12, en el que el ácido nucleico es ADN.

14. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12-13.

15. Un método para producir una célula huésped para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende la transformación celular mediante el vector según la reivindicación 14.

16. Una célula huésped para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 12-13.

17. Un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 16 en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, seguido de aislamiento y purificación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno resultante del mismo.

18. Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en una cantidad terapéuticamente eficaz en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica,

leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

20. Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

21. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

22. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en la que el otro compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o una combinación de los mismos.

23. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por AXL, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-22 en una cantidad terapéuticamente eficaz.

24. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por AXL según la reivindicación 23, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y al menos otro compuesto terapéuticamente activo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

25. El método de tratamiento de la enfermedad o trastorno según cualquiera de las reivindicaciones 23-24, en el que la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial,

cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

26. El método de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado, según cualquiera de las reivindicaciones 24-25, en el que el otro compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o una combinación de los mismos.

27. Uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-22 para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

28. El uso según cualquiera la reivindicación 27 del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y al menos otro compuesto terapéuticamente activo para tratar una enfermedad o trastorno mediado por AXL en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

29. El uso según la reivindicación 28, en la que la enfermedad o trastorno mediado por AXL se selecciona del grupo: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón no microcítico con una mutación EGFR, carcinoma de mama, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama cuatro veces negativo, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer de ovario, cáncer de ovario resistente a platino, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a docetaxel, cáncer de endometrio y sarcoma uterino, adenocarcinoma endometrioide, carcinoma seroso uterino, melanoma cutáneo, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer biliar, neoplasia maligna de la vía biliar extrahepática, cáncer de la vía biliar intrahepática, neoplasias malignas de la vesícula biliar, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neoplasias con alto nivel de expresión de AXL, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad hepática crónica, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad de Alzheimer o fibrosis pulmonar idiopática.

30. El uso según la reivindicación 28, en el que el otro compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, una molécula pequeña, un agente de terapia hormonal o cualquier combinación de los mismos.

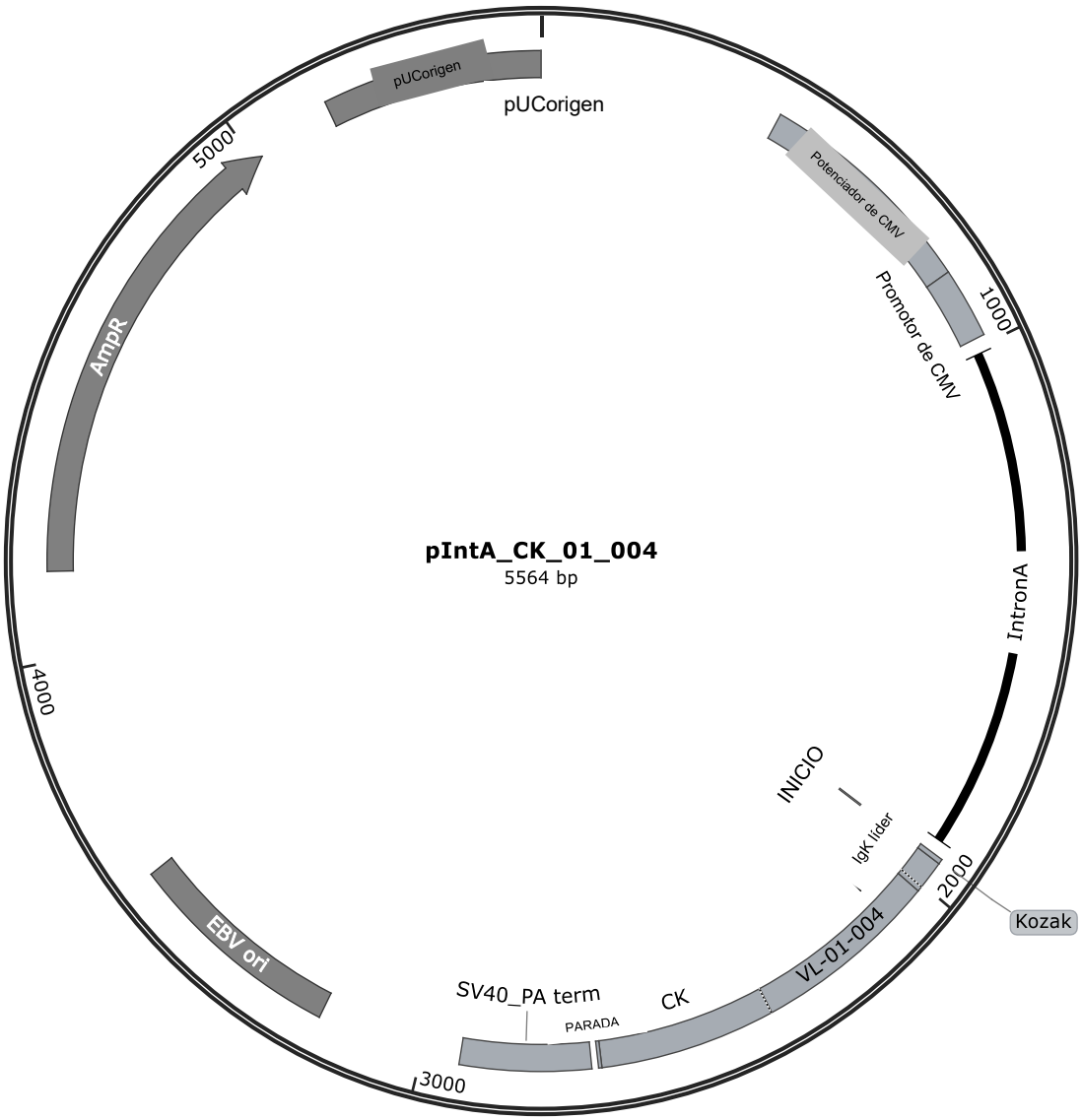
pUCorigen
pUCorigen
5000
AmpR
Potenciador de CMV
Promotor de CMV
1000
pIntA_CK_01_004
5564 bp
IntronA
4000
INICIO
IgK líder
2000
Kozak
EBV ori
VL-01-004
SV40_PA term
CK
PARADA
3000

Figura 1

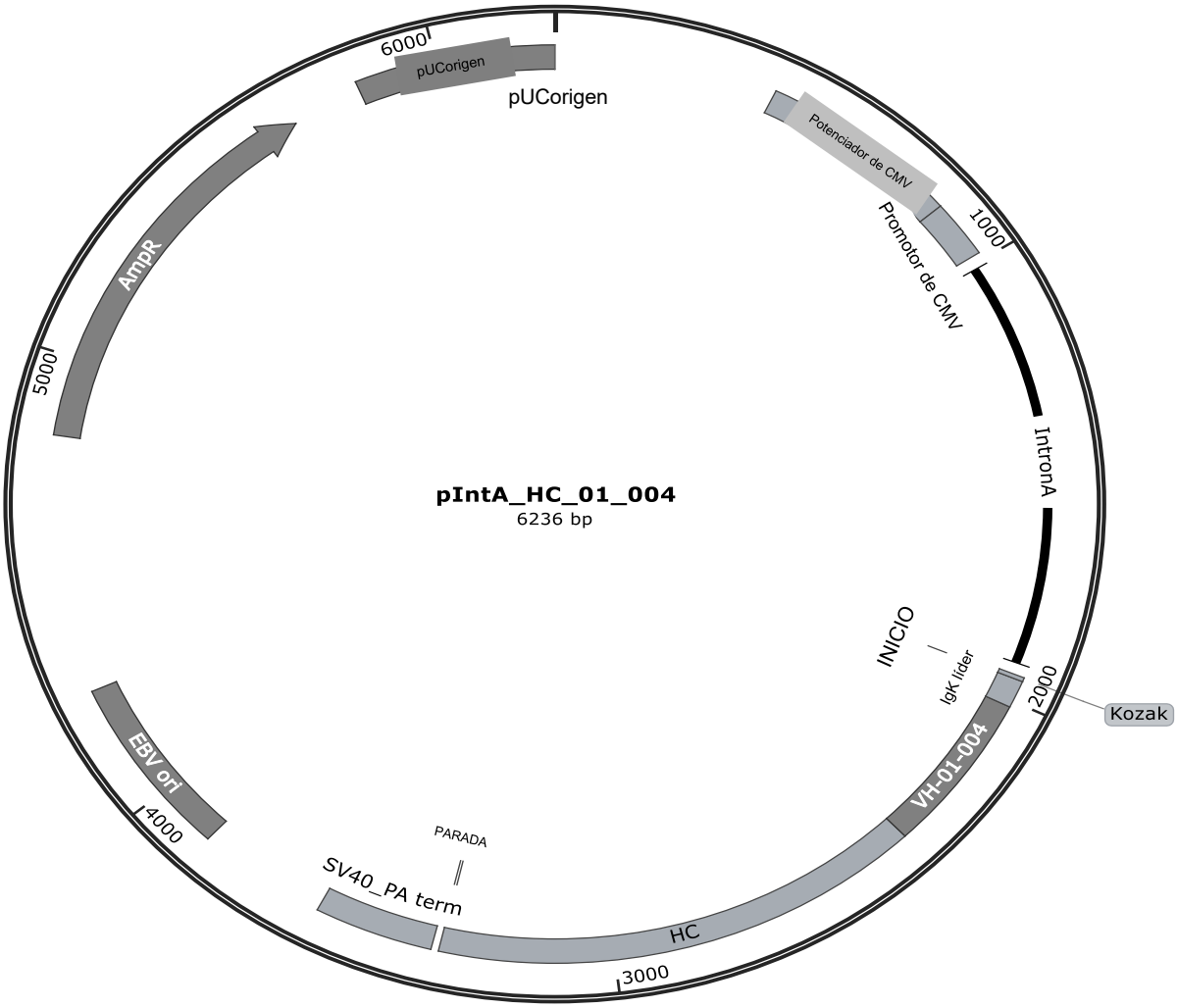

Figura 2

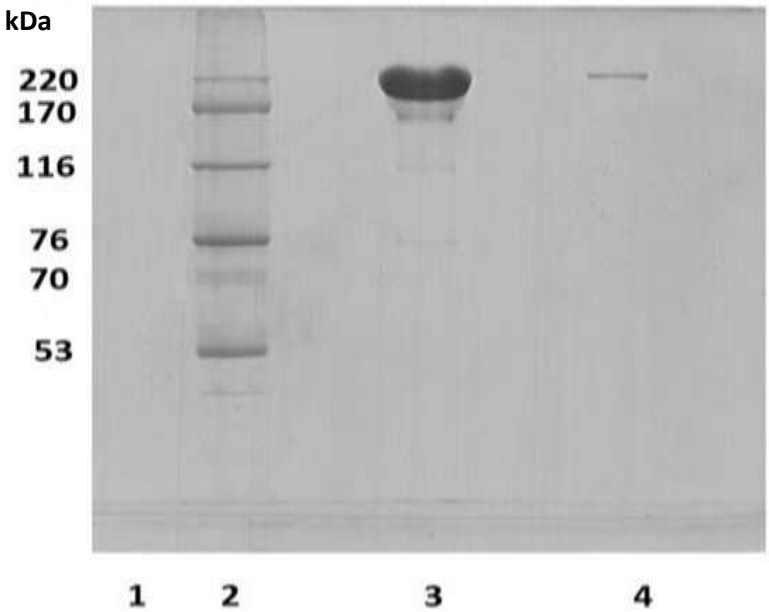

Figura 3

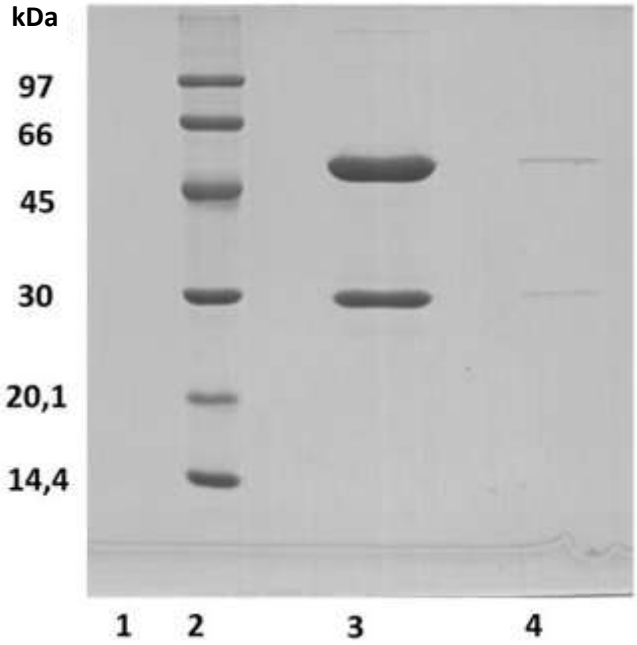

Figura 4

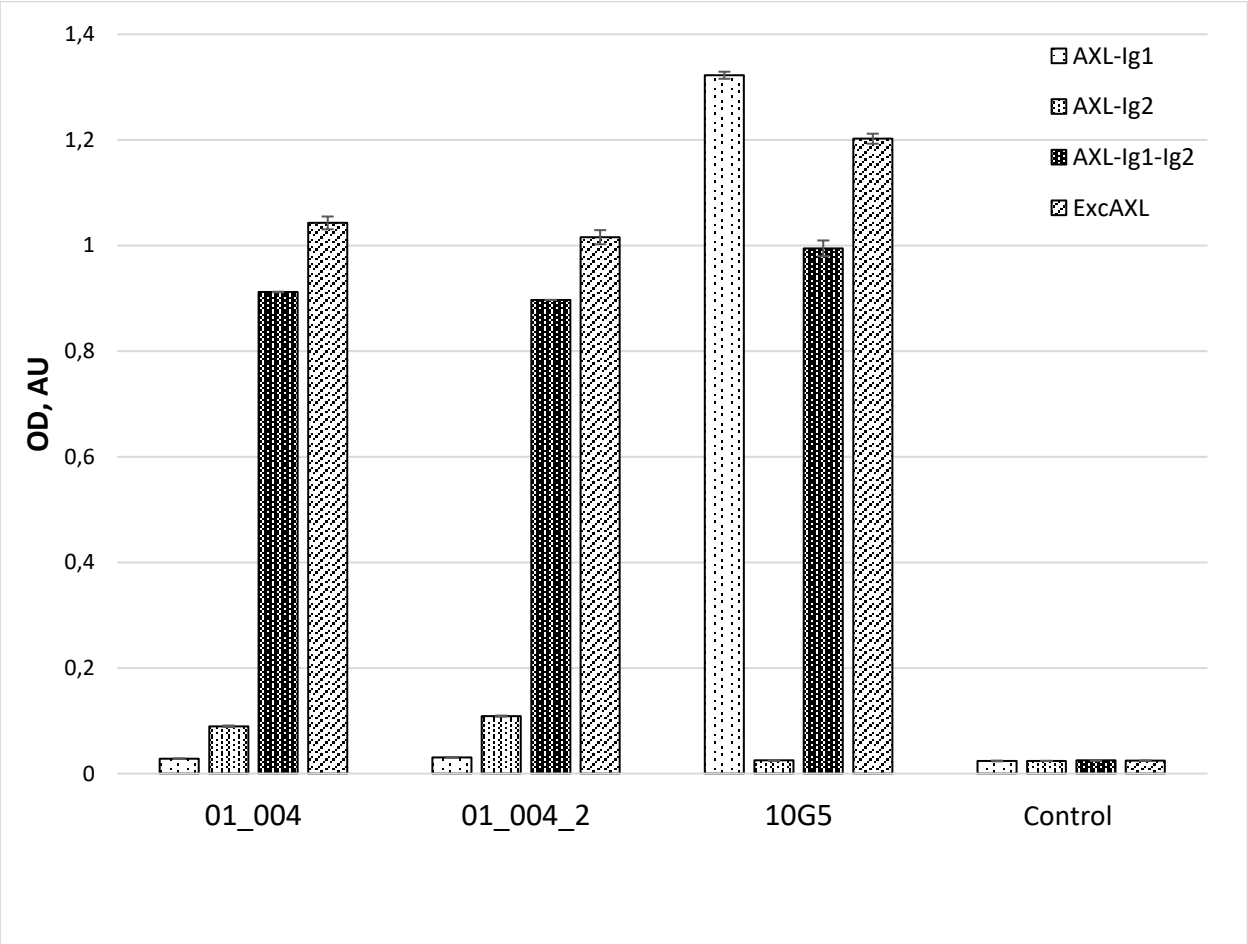

Figura 5

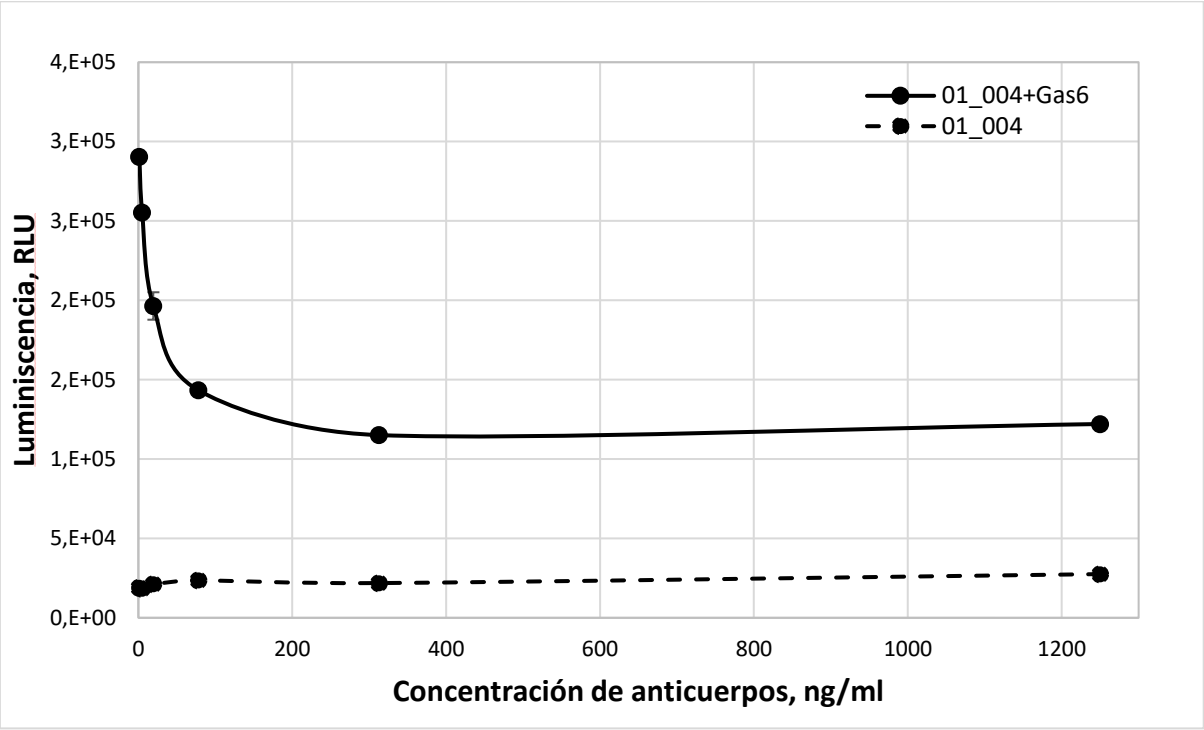

Figura 6

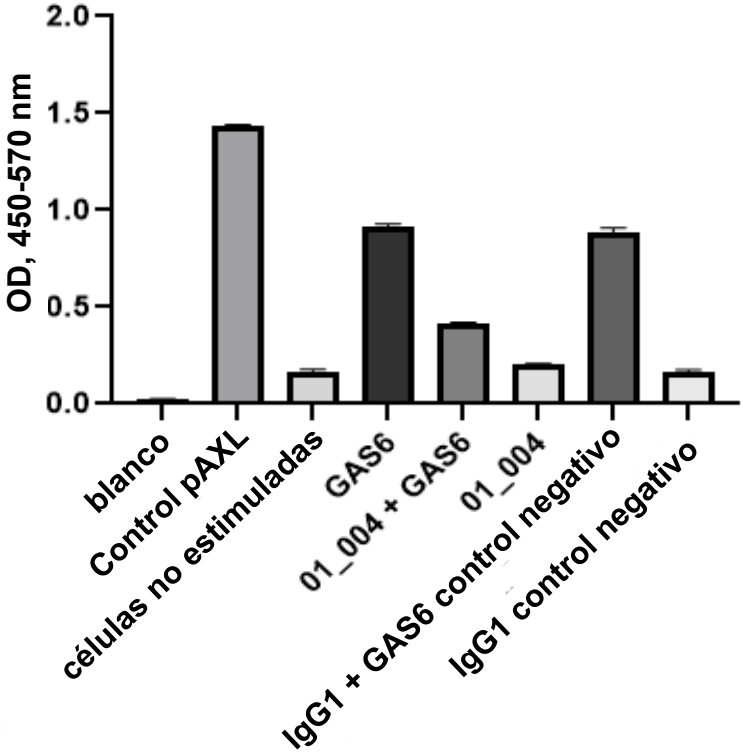

Figura 7

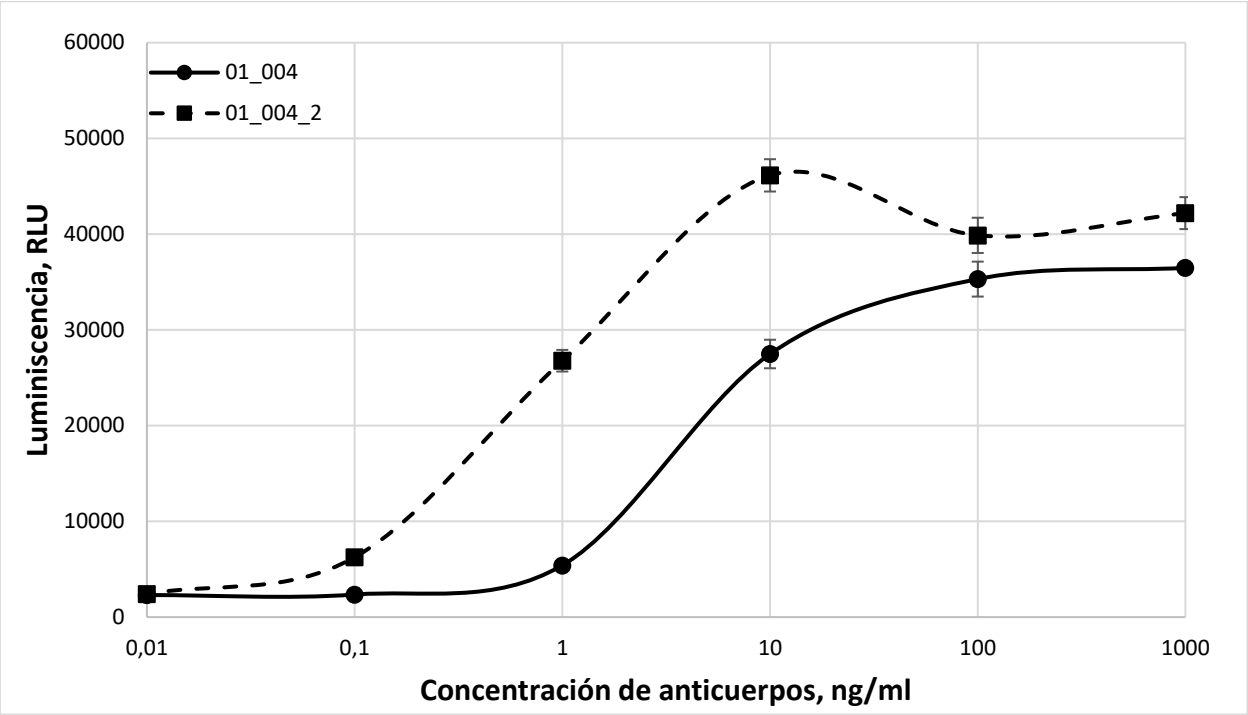

Figura 8

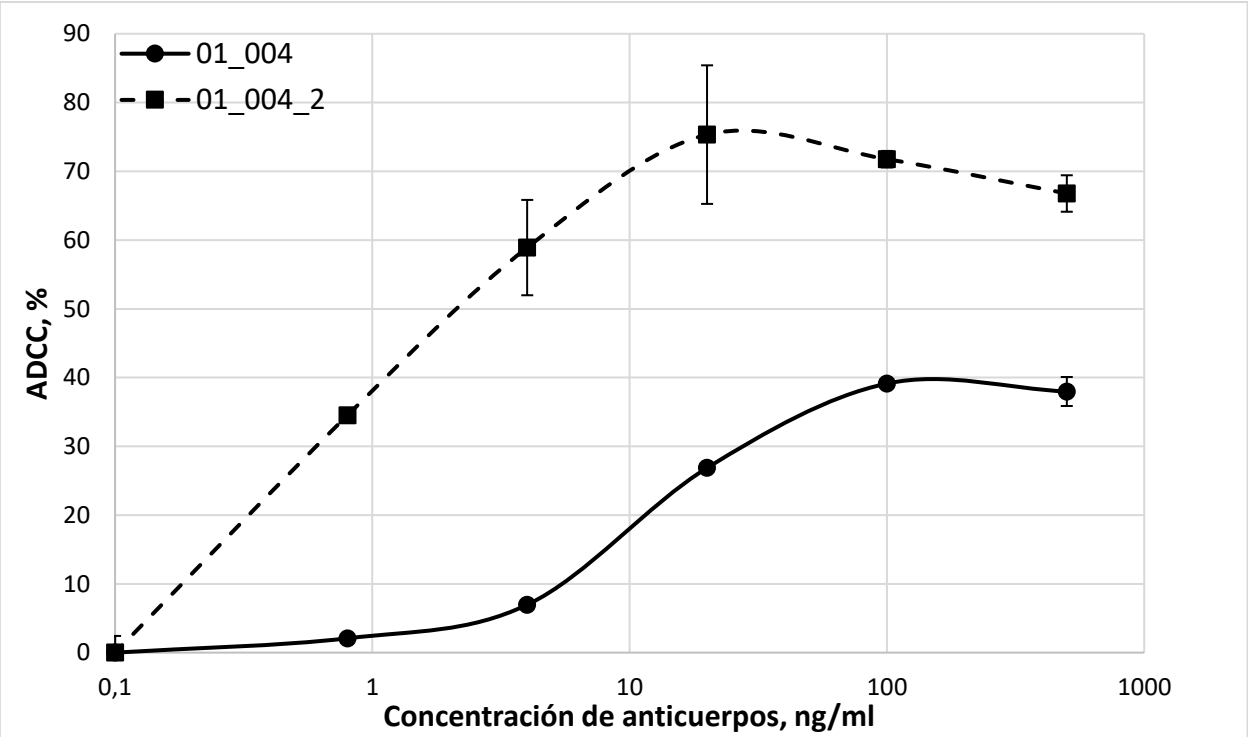

Figura 9

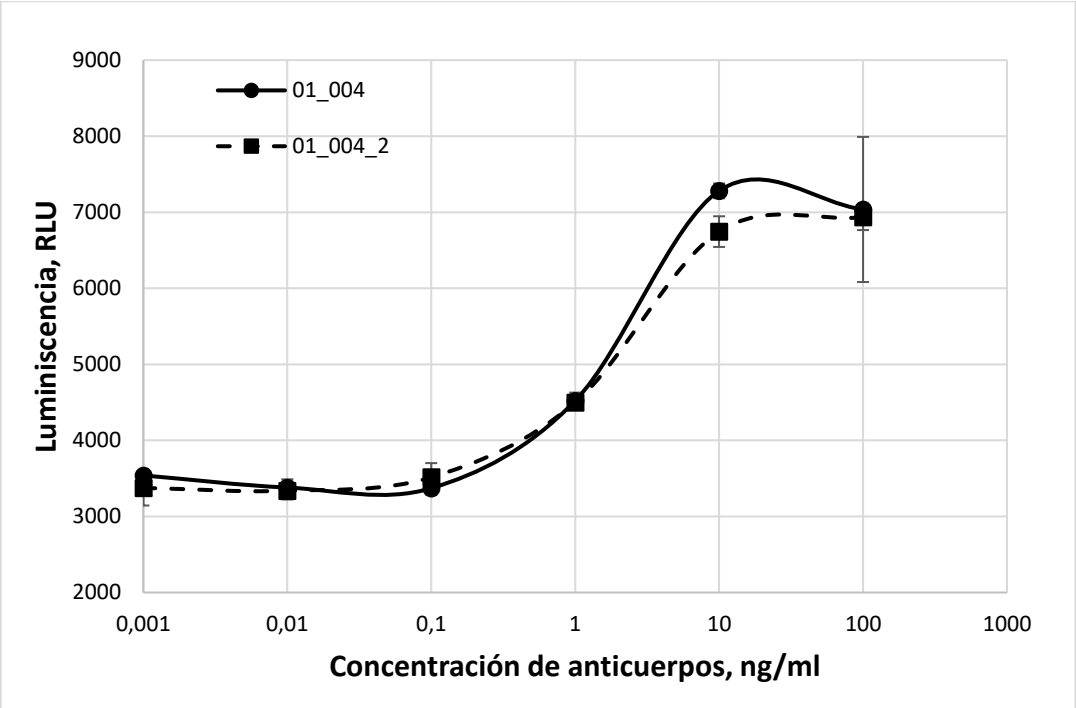

Figura 10

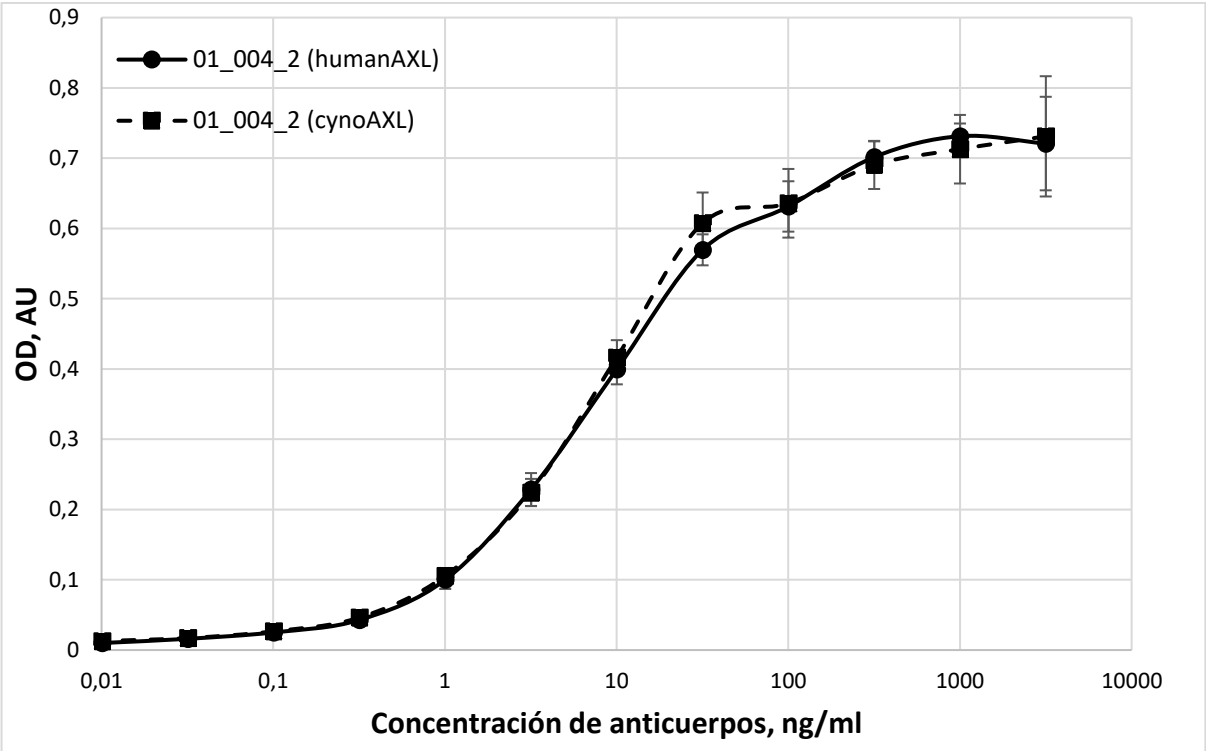

Figura 11

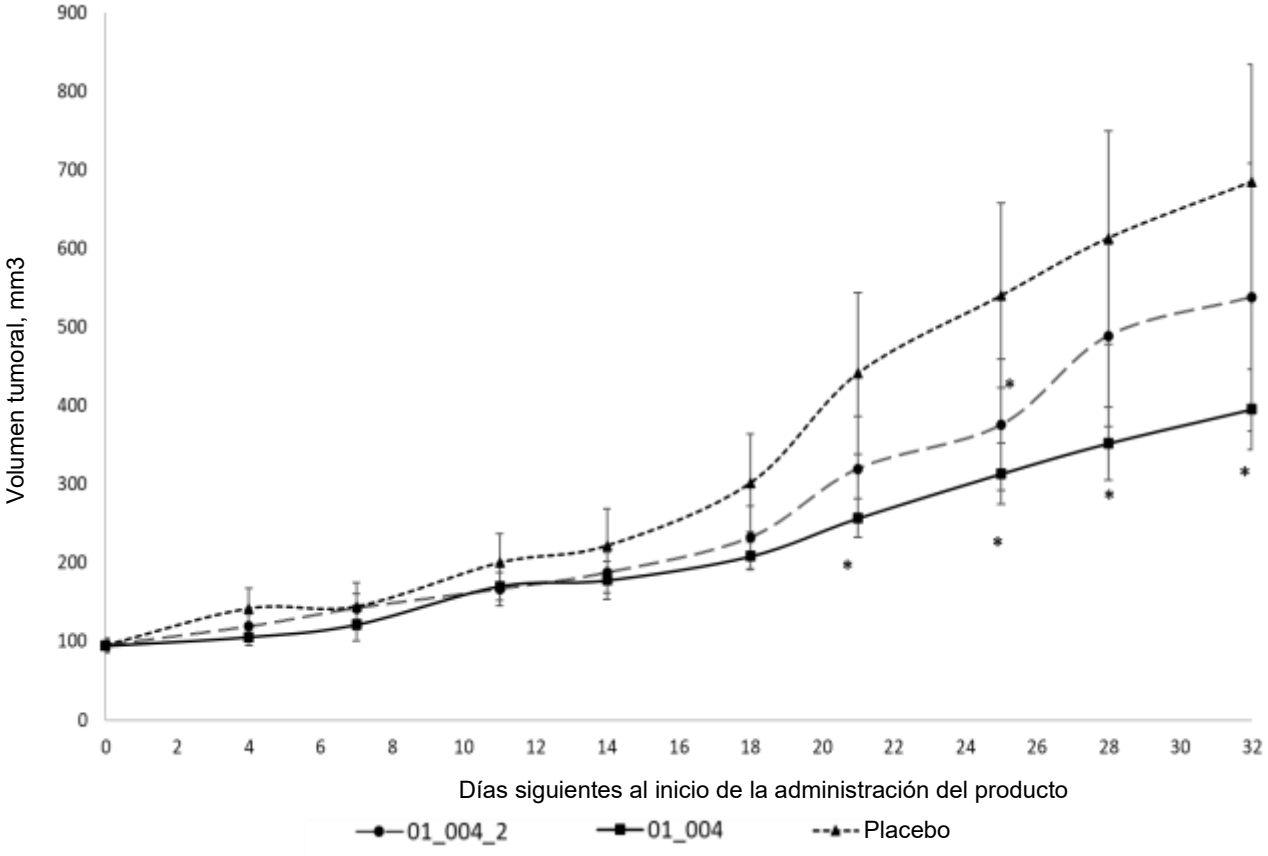

Figura 12

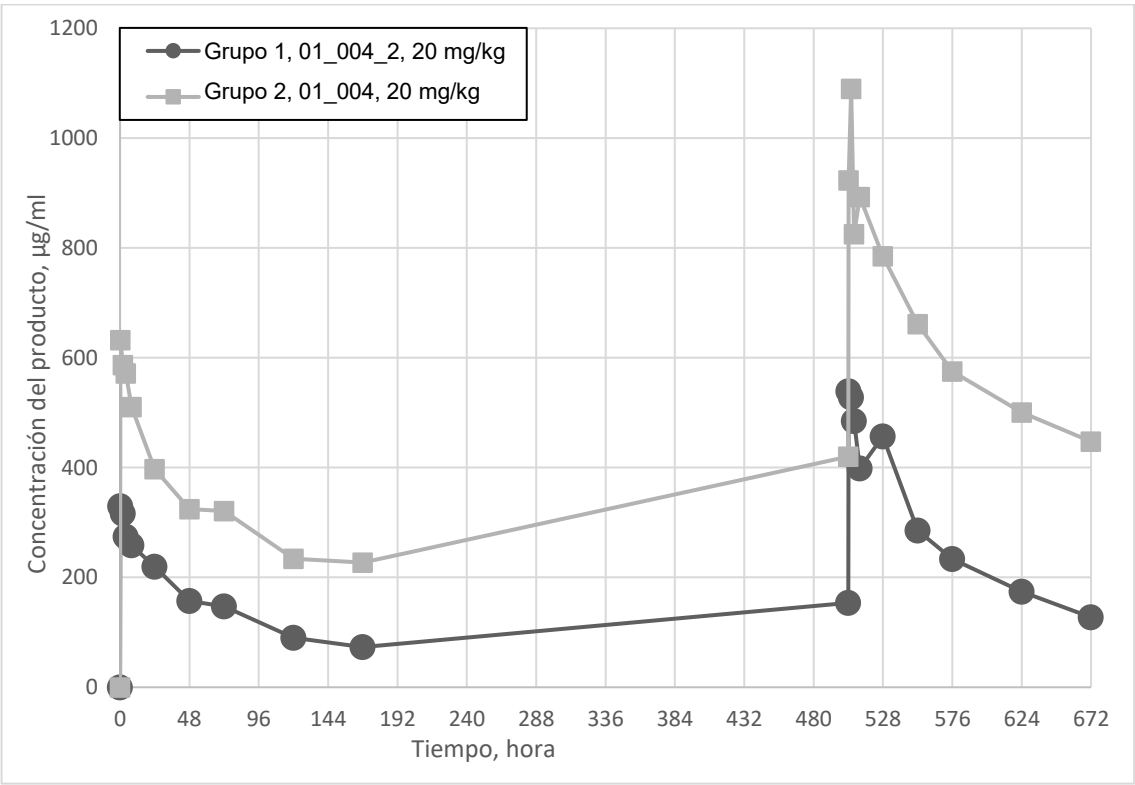

Figura 13

Resumen

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y la medicina, en particular a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a un antígeno del mismo que se une específicamente a AXL. La invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo, vectores de expresión, células huésped y métodos para producir los mismos, métodos para producir los anticuerpos según la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo según la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo según la invención y otros compuestos terapéuticamente activos, métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL, usos de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de los mismos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL, y usos de los anticuerpos y otros compuestos terapéuticamente activos para tratar enfermedades o trastornos mediados por AXL.

Nombre del proyecto: BCD-236

Estado: generado

Fecha creación: 2024-05-14

Última modificación: 2024-05-14

Información general

Solicitud actual

Número de solicitud: después

Oficina de PI: RU
Número de solicitud: 2023114863
Fecha de presentación: 2023-06-06
Referencia del expediente del solicitante: BCD-236

Solicitud prioritaria más temprana

Oficina de PI: RU
Número de solicitud: 2023114863
Fecha de presentación: 2023-06-06

Identificación de prioridades

Oficina de PI	Número de solicitud	Fecha de presentación
RU	2023114863	2023-06-06

Título de la invención

Idioma	Título de la invención
en	Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a AXL, y uso del mismo

Solicitante e inventor:

Nombre del solicitante: Joint Stock Company "BIOCAD"
Idioma: en
Nombre en latín: Joint Stock Company "BIOCAD"
Dirección de residencia: Russian Federation, 198515, g. Saint Petersburg, vn. ter. g. poselokStrelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89
Dirección para correspondencia: Russian Federation, 198515, g. Saint Petersburg, vn. ter. g. poselok Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89

Secuencias

Secuencia 1: "RU2023114863_seq._1"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
17	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..17	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
KSSQSVLLSA NQKNYLA                                                    17
```

Secuencia 2: "RU2023114863_seq_2"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
7	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..7	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
WASTRES                                                               7
```

Secuencia 3: "RU2023114863_seq_3"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
9	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..9	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
HQGYTLPWT                                                             9
```

Secuencia 4: "RU2023114863_seq_4"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
17	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..17	mol_type = proteína

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
		organismo = construcción sintética

Residuos

```
KSSQSVLLSA NQKNYLA                                          17
```

Secuencia 5: "RU2023114863_seq_5"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
7	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..7	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
WASTRES                                                     7
```

Secuencia 6: "RU2023114863_seq_6"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
9	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..9	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
HQGYTLPWT                                                   9
```

Secuencia 7: "RU2023114863_seq_7"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
5	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..5	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

FFGIH 5

Secuencia 8: "RU2023114863_seq_8"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
17	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..17	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

FTSRDGNDKY YADSVKG 17

Secuencia 9: "RU2023114863_seq_9"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
7	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..7	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

GNLAFDI 7

Secuencia 10: "RU2023114863_seq_10"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
7	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..7	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

GFSFSFF 7

Secuencia 11: "RU2023114863_seq_11"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
6	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..6	moL_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

```
SRDGND                                                   6
```

Secuencia 12: "RU2023114863_seq_12"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
7	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..7	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
GNLAFDI                                                  7
```

Secuencia 13: "RU2023114863_seq_13"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
113	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..113	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
DIVMTQSPDS LTASAGERAT INCKSSQSVL LSANQKNYLA WYQQKPGQSP RLLIYWASTR   60
ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISNLQPEDAA VYYCHQGYTL PWTFGSGTKV EIK         113
```

Secuencia 14: "RU2023114863_seq_14"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
116	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..116	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

```
QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFS FFGIHWIRQA PGKGLEWVAF TSRDGNDKYY         60
ADSVKGRFTI SKDNSKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCGRGN LAFDIWGEGT LVTVSS            116
```

Secuencia 15: "RU2023114863_seq_15"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
220	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..220	mol_type = proteína organismo - construcción sintética

Residuos

```
DIVMTQSPDS LTASAGERAT INCKSSQSVL LSANQKNYLA WYQQKPGQSP RLLIYWASTR              60
ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISNLQPEDAA VYYCHQGYTL PWTFGSGTKV EIKRTVAAPS              120
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS              180
LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC                        220
```

Secuencia 16: "RU2023114863_seq_16"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
444	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..444	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFS FFGIHWIRQA PGKGLEWVAF TSRDGNDKYY         60
ADSVKGRFTI SKDNSKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCGRGN LAFDIWGEGT LVTVSSASTK         120
GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS         180
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKVD KRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF         240
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR         300
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN         360
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN         420
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSP                                                444
```

Secuencia 17: "RU2023114863_seq_17"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
444	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..444	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFS FFGIHWIRQA PGKGLEWVAF TSRDGNDKYY        60
ADSVKGRFTI SKDNSKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCGRGN LAFDIWGEGT LVTVSSASTK        120
GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS        180
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPDVF        240
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR        300
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP EEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN        360
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN        420
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSP                                               444
```

Secuencia 18: "RU2023114863_seq_18"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
339	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..339	mol_type = otro ADN organism = construcción sintética

Residuos

```
gatattgtga tgactcagag ccccgactcc ctgactgcat ctgcaggaga gagggccacc        60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgtta ttgagtgcca accagaaaaa ctacttagct        120
tggtaccagc agaaacctgg acagtctcct aggctgctca tctactgggc atccacccga        180
gaatcggggg ttcctgatcg attcagcggc agtgggtccg gaacagattt cactcttacc        240
atcagcaacc tccagccgga agacgcggca gtgtattact gccaccaggg atatactctt        300
ccatggacat tcggcagtgg gaccaaggtg gagatcaaa                               339
```

Secuencia 19: "RU2023114863_seq_19"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
348	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..348	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

```
caggtgcagc tggtgcaatc tgggggaggc gtggtccagc ctggaaggtc cctcagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cagcttttcc ttcttcggca ttcactggat ccgccaggct     120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcattt acatcaagag atggaaatga caaatactat     180
gcagactcag tgaagggccg attcacaatc tccaaagaca actccaagaa cactgtgtat     240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcggtct attactgtgg aaggggaaat     300
ttggcttttg acatctgggg cgaagggacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag     348
```

Secuencia 20: "RU2023114863_seq_20"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
660	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..660	moL_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

```
gatattgtga tgactcagag ccccgactcc ctgactgcat ctgcaggaga gagggccacc      60
atcaattgta agtccagcca gagtgtgtta ttgagtgcca accagaaaaa ctacttagct     120
tggtaccagc agaaacctgg acagtctcct aggctgctca tctactgggc atccacccga     180
gaatcggggg ttcctgatcg attcagcggc agtgggtccg gaacagattt cactcttacc     240
atcagcaacc tccagccggg agacgcggca gtgtattact gccaccaggg atatactctt     300
ccatggacat tcggcagtgg gaccaaggtg gagatcaaac gtacggtggc tgcaccatct     360
gtcttcatct tccccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc     420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc     480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc     540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc     600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt     660
```

Secuencia 21: "RU2023114863_seq_21"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
1332	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..1332	mol_type = otro ADN organism = construcción sintética

Residuos

```
caggtgcagc tggtgcaatc tgggggaggc gtggtccagc ctggaaggtc cctcagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cagcttttcc ttcttcggca ttcactggat ccgccaggct     120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcattt acatcaagag atggaaatga caaatactat     180
gcagactcag tgaagggccg attcacaatc tccaaagaca actccaagaa cactgtgtat     240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcggtct attactgtgg aaggggaaat     300
ttggcttttg acatctgggg cgaagggacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag     360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaaagagca cctctggggg cacagcggcc     420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc     480
gccctgacca gcggcgtgca cacctcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc     540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctg catctgcaac     600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac     660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc     720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc     780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc     840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt     900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     960
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg     1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggacgagct gaccaagaac     1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1200
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaaaagcctc     1320
tccctgtccc cg                                                         1332
```

Secuencia 22: "RU2023114863_seq_22"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
1332	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..1332	mol_type = otro ADN organism = construcción sintética

Residuos

```
caggtgcagc tggtgcaatc tgggggaggc gtggtccagc ctggaaggtc cctcagactc    60
tccttgtgcag cctctggatt cagctttttc ttcttcggca ttcactggat ccgccaggct   120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcattt acatcaagag atggaaatga caaatactat   180
gcagactcag tgaagggccg attcacaatc tccaaagaca actccaagaa cactgtgtat   240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcggtct attactgtgg aaggggaaat   300
ttggcttttg acatctgggg cgaagggacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag   360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc   420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc   480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc   540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctA catctgcaac   600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac   660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc ggacgtcttc   720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc   780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc   840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt   900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc   960
aaggtctcca acaaagccct cccagcccct gaggagaaaa ccatctccaa agccaaaggg   1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggacgagct gaccaagaac   1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg   1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac   1200
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac   1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaaaagcctc   1320
tccctgtccc cg                                                       1332
```

Secuencia 23: "RU2023114863_seq_23"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
417	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..417	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
APRGTQAEES PFVGNPGNIT GARGLTGTLR CQLQVQGEPP EVHWLRDGQI LELADSTQTQ    60
VPLGEDEQDD WIVVSQLRIT SLQLSDTGQY QCLVFLGHQT FVSQPGYVGL EGLPYFLEEP   120
EDRTVAANTP FNLSCQAQGP PEPVDLLWLQ DAVPLATAPG HGPQRSLHVP GLNKTSSFSC   180
EAHNAKGVTT SRTATITVLP QQPRNLHLVS RQPTELEVAW TPGLSGIYPL THCTLQAVLS   240
DDGMGIQAGE PDPPEEPLTS QASVPPHQLR LGSLHPHTPY HIRVACTSSQ GPSSWTHWLP   300
VETPEGVPLG PPKNISATRN GSQAFVHWQE PRAPLQGTLL GYRLAYQGQD TPEVLMDIGL   360
RQEVTLELQG DGSVSNLTVC VAAYTAAGDG PWSLPVPLEA WRPVKEPSTP AFSWPWW      417
```

Secuencia 24: "RU2023114863_seq_24"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
426	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..426	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

```
APRGTQAEES PFVGNPGNIT GARGLTGTLR CQLQVQGEPP EVHWLRDGQI LELADSTQTQ    60
VPLGEDEQDD WIVVSQLRIT SLQLSDTGQY QCLVFLGHQT FVSQPGYVGL EGLPYFLEEP   120
EDRTVAANTP FNLSCQAQGP PEPVDLLWLQ DAVPLATAPG HGPQRSLHVP GLNKTSSFSC   180
EAHNAKGVTT SRTATITVLP QQPRNLHLVS RQPTELEVAW TPGLSGIYPL THCTLQAVLS   240
DDGMGIQAGE PDPPEEPLTS QASVPPHQLR LGSLHPHTPY HIRVACTSSQ GPSSWTHWLP   300
VETPEGVPLG PPKNISATRN GSQAFVHWQE PRAPLQGTLL GYRLAYQGQD TPEVLMDIGL   360
RQEVTLELQG DGSVSNLTVC VAAYTAAGDG PWSLPVPLEA WRPVKEPSTP AFSWPWWGGG   420
HHHHHH                                                              426
```

Secuencia 25: "RU2023114863_seq_25"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
363	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..363	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

```
APRGTQAEES PFVGNPGNIT GARGLTGTLR CQLQVQGEPP EVHWLRDGQI LELADSTQTQ    60
VPLGEDEQDD WIVVSQLRIT SLQLSDTGQY QCLVFLGHQT FVSQPGYVGL EGLGGGGSGG   120
GGSGGGGSGG GGSAAAAATC PQCPAPELPG GPSVFVFPPK PKDVLSISGR PEVTCVVVDV   180
GKEDPEVNFN WYIDGVEVRT ANTKPKEEQF NSTYRVVSVL PIQHQDWLTG KEFKCKVNNK   240
ALPAPIERTI SKAKGQTREP QVYTLAPHRE ELAKDTVSVT CLVKGFYPAD INVEWQRNGQ   300
PESEGTYANT PPQLDNDGTY FLYSKLSVGK NTWQRGETLT CVVMHEALHN HYTQKSISQS   360
PGK                                                                 363
```

Secuencia 26: "RU2023114863_seq_26"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
335	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..335	moLtype = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

```
PYFLEEPEDR TVAANTPFNL SCQAQGPPEP VDLLWLQDAV PLATAPGHGP QRSLHVPGLN    60
KTSSFSCEAH NAKGVTTSRT ATITVGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSAAAAA TCPQCPAPEL   120
PGGPSVFVFP PKPKDVLSIS GRPEVTCVVV DVGKEDPEVN FNWYIDGVEV RTANTKPKEE   180
QFNSTYRVVS VLPIQHQDWL TGKEFKCKVN NKALPAPIER TISKAKGQTR EPQVYTLAPH   240
REELAKDTVS VTCLVKGFYP ADINVEWQRN GQPESEGTYA NTPPQLDNDG TYFLYSKLSV   300
GKNTWQRGET LTCVVMHEAL HNHYTQKSIS QSPGK                              335
```

Secuencia 27: "RU2023114863_seq_27"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
448	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..448	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
APRGTQAEES PFVGNPGNIT GARGLTGTLR CQLQVQGEPP EVHWLRDGQI LELADSTQTQ    60
VPLGEDEQDD WIVVSQLRIT SLQLSDTGQY QCLVFLGHQT FVSQPGYVGL EGLPYFLEEP    120
EDRTVAANTP FNLSCQAQGP PEPVDLLWLQ DAVPLATAPG HGPQRSLHVP GLNKTSSFSC    180
EAHNAKGVTT SRTATITVGG GGSGGGGSGG GGSGGGGSAA AAATCPQCPA PELPGGPSVF    240
VFPPKPKDVL SISGRPEVTC VVVDVGKEDP EVNFNWYIDG VEVRTANTKP KEEQFNSTYR    300
VVSVLPIQHQ DWLTGKEFKC KVNNKALPAP IERTISKAKG QTREPQVYTL APHREELAKD    360
TVSVTCLVKG FYPADINVEW QRNGQPESEG TYANTPPQLD NDGTYFLYSK LSVGKNTWQR    420
GETLTCVVMH EALHNHYTQK SISQSPGK                                       448
```

Secuencia 28: "RU2023114863_seq_28"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene fragmentos de ADN y ARN	Secuencia omitida
472	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de caracterización	Ubicación de característica	Calificadores
fuente	1..472	mol_type = proteína organism = construcción sintética

Residuos

```
EESPFVGNPG NITGARGLTG TLRCQLQVQG EPPEVHWLRD GQILELADST QTQVPLGEDE    60
QDDWIVVSQL RIASLQLSDA GQYQCLVFLG HQNFVSQPGY VGLEGLPYFL EEPEDRTVAA    120
NTPFNLSCQA QGPPEPVDLL WLQDAVPLAT APGHGPQRNL HVPGLNKTSS FSCEAHNAKG    180
VTTSRTATIT VLPQQPRNLH LVSRQPTELE VAWTPGLSGI YPLTHCTLQA MLSDNEVGIQ    240
AGEPDPPEEP LTLQASVPPH QLRLGSLHPH TPYHIRVACT SSQGPSSWTH WLPVETPEGV    300
PLGPPENISA TRNGSQAFVH WQEPRAPLQG TLLGYRLAYQ GQDTPEVLMD IGLRQEVTLE    360
LQGDGSVSNL TVCVAAYTAA GDGPWSLPVP LEAWRPGQAQ PVHQLESWIQ GLIHDLFLVP    420
PIVKETSAPA FSWPEGGGSL VPRGSAAAGG GESHHHHHHG DILDYKDDDD KV            472
```

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 10 June 2024 (10.06.2024)
Information valid as of: 07 October 2024 (07.10.2024)
Report generated on: 27 November 2025 (27.11.2025)

(10) Publication number:
WO2024/253562

(43) Publication date:
12 December 2024 (12.12.2024)

(26) Publication language:
English (EN)

(21) Application Number:
PCT/RU2024/050107

(22) Filing Date:
22 May 2024 (22.05.2024)

(25) Filing language:
English (EN)

(31) Priority number(s):
2023114863 (RU)

(31) Priority date(s):
06 June 2023 (06.06.2023)

(31) Priority status:
Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01); **C07K 16/40** (2006.01); **C12N 15/13** (2006.01); **A61K 39/00** (2006.01); **A61P 35/00** (2006.01)

(71) Applicant(s):
JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" [RU/RU]; vn. ter. g. poselok Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89 Saint Petersburg, 198515 (RU) *(for all designated states)*

(72) Inventor(s):
GORDEEV, Aleksandr Andreevich; Varshavskoye sh., 141A, k.5, kv. 208 G. Moscow, 117405 (RU)
PUCHKOVA, Mariia Yurievna; ul. Kabakova, d. 77a, kv. 52 Tulskaya obl., g. Tula, 300036 (RU)
PUTINTCEVA, Iuliia Vladimirovna; ul. 2-aya Novovatutinskaya, d.5, kv.378 G. Moscow, p. Desenovskoye, 108836 (RU)
PURVINSH, Iana Voldemarovna; ul. Petrovskaya, d. 3 Omskaya obl., Isilkulskiy r-n, d. Petrovka, 646010 (RU)
DMITRIEVA, Mariia Denisovna; ul. Ippodromskaia d.45, kv. 6 G. Novosibirsk, 630005 (RU)
KOCHETKOVA, Alina Sergeevna; ul. Mira, d.51 Novosibirskaya obl., Novosibirskiy r-n, p. Vorobyevsky, 630024 (RU)
VINOGRADOVA, Elena Vladimirovna; Gostilitskoe sh., 23/1, kv 22 G. Saint Petersburg, gor. Peterhof, 198504 (RU)
MOROZOV, Dmitry Valentinovich; Admiraltejskij r-on, ul. Pochtamtskaya, d. 20, kv. 3 Saint-Petersburg, 190000 (RU)

(74) Agent(s):
MELCHAEVA, Olga Anatolevna; vn. ter. g. poselok Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89 G.Saint Petersburg, 198515 (RU)

(54) Title (EN): MONOCLONAL ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF THAT SPECIFICALLY BINDS TO AXL, AND USE THEREOF

(54) Title (FR): ANTICORPS MONOCLONAL OU FRAGMENT DE LIAISON À L'ANTIGÈNE DE CELUI-CI SE LIANT DE MANIÈRE SPÉCIFIQUE À AXL ET SON UTILISATION

(57) Abstract:

(EN): The present invention relates to the field of biotechnology and medicine, in particular to a monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to AXL. The invention further relates to nucleic acids encoding said antibody, expression vectors, host cells and methods for producing same, methods for producing the antibodies according to the invention, pharmaceutical compositions comprising the antibody according to the invention, pharmaceutical compositions comprising the antibody according to the invention and other therapeutically active compounds, methods for treating AXL-mediated diseases or disorders, uses of the antibodies or pharmaceutical compositions thereof for treating AXL-mediated diseases or disorders, and uses of the antibodies and other therapeutically active compounds for treating AXL-mediated diseases or disorders.

(FR): La présente invention relève du domaine de la biotechnologie et de la médecine, et concerne en particulier un anticorps monoclonal ou un fragment de liaison à l'antigène de celui-ci se liant de manière spécifique AXL. L'invention concerne en outre des acides nucléiques codant pour ledit anticorps, des vecteurs d'expression, des cellules hôtes et leurs procédés de production, des procédés de production des anticorps selon l'invention, des compositions pharmaceutiques comprenant l'anticorps selon l'invention, des compositions pharmaceutiques comprenant l'anticorps selon l'invention et d'autres composés thérapeutiquement actifs, des méthodes de traitement de maladies ou de troubles à médiation par AXL, des utilisations des anticorps ou des compositions

pharmaceutiques de ceux-ci pour le traitement de maladies ou de troubles à médiation par AXL, et des utilisations des anticorps et d'autres composés thérapeutiquement actifs pour le traitement de maladies ou de troubles à médiation par AXL.

International search report:

Received at International Bureau: 19 September 2024 (19.09.2024) [RU]

International Report on Patentability (IPRP) Chapter II of the PCT:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW
European Patent Office (EPO) : AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR
African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG
African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM

Declarations:

Declaration made as to the identity of the inventor (PCT Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))
Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate
Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii))
Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America

77 А Д 2788299

ДОВЕРЕННОСТЬ

Город Москва.
Двадцатого декабря две тысячи двадцать второго года.

Акционерное общество "БИОКАД", учрежденное и действующее в соответствии с законодательством Российской Федерации, зарегистрированное по адресу: 198515, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул. Связи, д. 38, стр. 1, помещ. 89, зарегистрированное под идентификационным налоговым номером 5024048000, (далее - **«Доверитель»**), в лице Мельчаевой Ольги Анатольевны, действующей на основании доверенности с правом передоверия от 11 февраля 2022 г. с цифровой меткой
№ 3.590.351, посредством предоставления настоящей доверенности

ВОЛЬФ МЕНДЕС АБОГАДОС АСОЦИАДОС (WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS) компании, учрежденной и действующей в соответствии с законодательством **Республики Колумбия**, зарегистрированной по адресу: Диагональ 83А № 23 - 90, Богота - Колумбия, зарегистрированное под идентификационным налоговым номером NIT. 830029907-2 (далее - «Компания»).

В отношении заявок на регистрацию товарных знаков, заявок на выдачу патентов; патентов и товарных знаков (далее - **«Объекты Интеллектуальной Собственности»**) в **Республике Колумбия.**

Наделяет **Компанию** следующими полномочиями:

1. Осуществлять действия, необходимые для регистрации Объектов Интеллектуальной Собственности на имя Доверителя и восстановления прав Доверителя в отношении Объектов Интеллектуальной Собственности в том числе:

- представлять Доверителя перед федеральными, государственными и муниципальными органами власти и управлениями, перед любыми лицами, уполномоченными осуществлять регистрацию и учет прав в отношении объектов интеллектуальной собственности (далее - **«Органы Регистрации»**);
- запрашивать, получать, предоставлять и подавать любые заявки, материалы заявок, запросы экспертизы, свидетельства и сертификаты;
- запрашивать, получать, подготавливать, предоставлять и подавать формы, ответы, заявления, декларации, акты передачи прав, запросы;
- предоставлять и подавать любые изменения материалов заявок (включая, но не ограничиваясь, формулы, описания, чертежей, реферата, списка последовательностей и иных поданных документов), а также любые другие документы и информацию в любой форме (оригиналы и удостоверенные, авторизованные копии документов), необходимые для ведения/ приостановления / прекращения делопроизводства по заявкам;
- отзывать заявки, а также иным образом добровольно прекращать действия по регистрации Объектов Интеллектуальной Собственности на имя Доверителя;
- осуществлять действия, необходимые для досрочного прекращения действия патентов/ свидетельств на Объекты Интеллектуальной Собственности.

2. Подготавливать и предоставлять любые необходимые документы в целях изменения информации о Доверителе и/или авторах / изобретателях Объектов Интеллектуальной Собственности в государственных реестрах, содержащих информацию о Доверителе и/или авторах Объектов Интеллектуальной Собственности.

3. Подавать обращения, заявления, запросы, претензии с целью обжалования действий и бездействий Органов Регистрации с целью защиты прав и интересов Доверителя в отношении Объектов Интеллектуальной Собственности, возобновления действий по регистрации Объектов Интеллектуальной Собственности, а также в целях приостановления и аннулирования любой заявки или регистрации, которая может привести к какому-либо нарушению прав Доверителя на Объекты Интеллектуальной Собственности.

4. Представлять Доверителя перед федеральными, государственными и муниципальными органами власти и управлениями, любыми апелляционными

г.Моск-

ООО «Типография «Еврокония 2 СПб» г. Санкт-Петербург, 2022 г. Уровень «В»

-ва

инстанциями, палатами по рассмотрению патентных споров, любыми судами, любыми арбитрами и любыми арбитражами, перед любым лицом в любых органах по разрешению споров, связанных с обжалованием действий и бездействий Органов Регистрации, а также с приостановлением и аннулированием заявок и регистраций, которые могут привести к нарушению прав Доверителя на Объекты Интеллектуальной Собственности, путем подачи и отзыва возражений, заявлений на оппозицию, оппозиций, исков, ходатайств, отзывов, позиций, апелляций и кассаций, а также любых иных документов в любой форме.

5. Уплачивать все пошлины и сборы, а также производить любые иные платежи, предусмотренные законодательством **Республики Колумбия**, связанные с выполнением полномочий, указанных в настоящей Доверенности.

Настоящая Доверенность уполномочивает Представителей выполнять все действия исключительно в интересах Доверителя, выбирая способы и меры соразмерные и необходимые для достижения соответствующих целей.

Настоящая Доверенность и любые споры или претензии, возникающие из или в связи с ней, ее предметом или формированием, регулируются и истолковываются в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Настоящая Доверенность действует с даты ее подписания и действует в течение 5 (пяти) лет с даты подписания без права передоверия.

Настоящая доверенность может быть отменена в любое время Доверителем путем уведомления Представителей.

Подпись: Мельчаева Ольга Анатольевна

ФИО: Мельчаева Ольга Анатольевна
Должность или позиция: Директор департамента интеллектуальной собственности
Название компании: АО «БИОКАД»

Российская Федерация

Город Москва

Двадцатого декабря две тысячи двадцать второго года

Настоящая доверенность удостоверена мной, Козлачковым Алексеем Андреевичем, временно исполняющим обязанности нотариуса города Москвы Зубовской Валентины Алексеевны.

Содержание доверенности соответствует волеизъявлению заявителя.
Доверенность подписана в моем присутствии.
Личность заявителя установлена, дееспособность проверена.
Правоспособность юридического лица и полномочия его представителя проверены.

Зарегистрировано в реестре: № **77/732-н/77-2022-15-506**.

Уплачено за совершение нотариального действия: 3400 руб. 00 коп.

А.А. Козлачков

НОТАРИУС В.А. ЗУБОВСКАЯ ОКРУГ: Г. МОСКВА НОТАРИАЛЬНЫЙ

30.560.963

Компьютерная система "Экспресс"

77 АД 2788299
PODER DE ABOGADO

la ciudad de Moscú
veinte de diciembre de dos mil veintidós años

Joint Stock Company «BIOCAD», una empresa establecida y que opera de conformidad con la legislación de la Federación de Rusia, con domicilio social en, 198515, Saint Petersburg, vn. ter. g. poselok Strelna, p. Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89, registrada bajo el número de identificación fiscal ("INN") 5024048000 (en lo sucesivo denominado **"Otorgante"**), representada por **Melchaeva Olga Anatolevna,** quien actúa en virtud de un poder notarial con derecho de sustitución de fecha 11 de febrero de 2022 con una marca digital No. 3.590.351, mediante la concesión de este Poder a

WOLF • MENDEZ • ABOGADOS ASOCIADOS, sociedad constituida y que Opera de conformidad con la legislación de la **República de Colombia**, con domicilio en: la Diagonal 83A No. 23 - 90, de Bogotá D.C. – Colombia (en lo sucesivo denominados **"Empresa"**)

En relación con las solicitudes de registro de marcas, solicitudes de patentes; patentes y marcas registradas, (en adelante, **"Objetos de Propiedad Intelectual")** en la **República de Colombia**

Autoriza legalmente a la **Empresa** a:

1. Realizar todas las acciones necesarias para registrar los Objetos de Propiedad Intelectual en nombre del Otorgante y restaurar los derechos del Otorgante con respecto a los Objetos de Propiedad Intelectual, lo que incluye:
   - Representar al Otorgante ante las agencias y autoridades gubernamentales federales, estatales y municipales, y ante cualquier persona autorizada para inscribir y registrar los derechos con respecto a los Objetos de Propiedad Intelectual (en adelante - **"Autoridades de Registro");**
   - Solicitar, recibir, preparar y presentar solicitudes, materiales de solicitud, exámenes y certificados;
   - Solicitar, recibir, preparar, presentar y archivar formularios, respuestas, declaraciones, escrituras de cesión (cesiones de patentes), consultas;
   - Preparar y presentar cualquier modificación de los materiales de la solicitud (incluidas, entre otras, reivindicaciones, descripción, dibujos, resumen, lista de secuencias y otros documentos presentados), así como otros documentos e información en cualquier forma (originales y copias certificadas y autorizadas de documentos), necesarios para realizar, suspender o proceder con el procesamiento de las solicitudes;
   - Desistir de las solicitudes o renunciar voluntariamente al registro de los derechos sobre los Objetos de Propiedad Intelectual a nombre del Otorgante;
   - Tomar las medidas necesarias para la terminación anticipada de patentes / certificados para los Objetos de Propiedad Intelectual.

2. Preparar y presentar los documentos necesarios para modificar la información sobre el Otorgante y/o los autores/inventores de los Objetos de Propiedad Intelectual en los registros estatales que contengan información sobre el Otorgante y / o los autores de los Objetos de Propiedad Intelectual.
3. Presentar recursos, solicitudes, quejas para impugnar los actos y omisiones de las Autoridades de Registro a fin de proteger los derechos e intereses del Otorgante con respecto a los Objetos de Propiedad Intelectual, con el objetivo de reanudar la acción para el registro de los Objetos de Propiedad Intelectual, y con el fin de suspender y retirar cualquier solicitud o registro que pueda dar

lugar a la vulneración de los intereses del Otorgante con respecto a los Objetos de Propiedad Intelectual.
4. Representar al Otorgante ante las agencias y autoridades gubernamentales federales, estatales y municipales, cualquier junta de apelaciones, cualquier junta de primera instancia, cualquier tribunal, cualquier árbitro o cualquier arbitraje, ante cualquier persona en cualquier organismo dedicado a la resolución de disputas relacionadas con apelaciones contra actos y omisiones de las Autoridades de Registro y a la suspensión y retiro de solicitudes y registros que puedan resultar en, revisiones, posiciones, apelaciones y casaciones, así como cualquier otro documento en cualquier otra forma.
5. Pagar todos los deberes, honorarios, cargos y realizar cualquier otro pago requerido por la ley de la **República de Colombia** relacionado con el ejercicio de los poderes establecidos en este Poder.

Este Poder autorizar a la **Empresa** a realizar todas las acciones únicamente en interés del Otorgante, eligiendo métodos y medidas que sean proporcionados y necesarios para ejercer cualquiera de los poderes para lograr los objetivos relevantes.

Este Poder y cualquier disputa o reclamo que surja de o en conexión con él, su objeto o su formación se regirán e interpretarán de conformidad con la ley de la Federación de Rusia.

Este Poder notarial será efectivo a partir de la fecha de su firma y tendrá una validez de 5 (cinco) años a partir de la fecha de la firma sin derecho de sustitución.

Este Poder puede ser revocado en cualquier momento por el Otorgante mediante notificación a la **Empresa**.

Todos los actos realizados previamente por la **Empresa** en nombre del otorgante se ratifican, confirman y aceptan expresamente por la presente.

Firma: Melchaeva Olga Anatolevna

Nombre del Signatario: Melchaeva Olga Anatolevna
Título o Cargo: Director del Departamento de Propiedad Intelectual
Nombre de la Empresa: JSC "BIOCAD"

Federación de Rusia
Ciudad de Moscú
El veinte de diciembre del año dos mil veintidós
Este poder está certificado por mí, Kozlachkov Aleksei Andreyevich, el notario en funciones, Zubovskaya Valentina Alekseevna de la ciudad de Moscú.
El contenido del poder se ajusta a la voluntad del solicitante.
El poder fue firmado en mi presencia.
Se establece la identidad del solicitante, se verifica la capacidad jurídica.
Se verifica la capacidad jurídica de la persona jurídica y los poderes de su representante.

Inscrito en el registro: **№ 77/732-н/77-2022-15-506**

Pagado por la actuación notarial: 3400 rublos. 00 cop.

A.A. Kozlachkov

Перевод данного текста выполнен переводчиком Князевой Виталиной Васильевной.	*Translation of this text done by translator Knyazeva Vitalina Vasilyevna. /Signature/*
Российская Федерация	**The Russian Federation**
Город Москва.	**City of Moscow.**
Двадцать третьего декабря две тысячи двадцать второго года.	**The twenty-third of December two thousand and twenty-two.**
Я, Моисеева Лилия Владимировна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Князевой Виталины Васильевны.	I, Moiseeva Liliya Vladimirovna, notary of the city of Moscow, certify the authenticity of the signature of the translator Knyazeva Vitalina Vasilyevna.
Подпись сделана в моем присутствии.	Signature is made in my presence.
Личность подписавшего документ установлена.	The personality of signing [illegible] is identified.
Зарегистрировано в реестре: № 50/995-н/77-2022- 29-1362	Registration No.: № 50/995-н/77-2022- 29-1362
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.	Paid for the performance of [illegible]rial act: 400 rubles 00 kopecks
Л.В. Моисеева	*/Signature/* L.V. Moiseeva
	Round stamp with the Russian Federation coat of arms and the following text: "NOTARY L.V. MOISEEVA NOTARY DISTRICT MOSCOW CITY
Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 3 лист(-а,-ов).	Totally bound, numbered and sealed 3 pages.
	Round stamp with the Russian Federation coat of arms and the following text: "NOTARY L.V. MOISEEVA NOTARY DISTRICT MOSCOW CITY

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACIÓN LEGAL

Fecha Expedición: 21 de octubre de 2025 Hora: 11:12:23
Recibo No. AB25607741
Valor: $ 11,600

CÓDIGO DE VERIFICACIÓN B2560774198E91

Verifique el contenido y confiabilidad de este certificado, ingresando a www.ccb.org.co/certificadoselectronicos y digite el respectivo código, para que visualice la imagen generada al momento de su expedición. La verificación se puede realizar de manera ilimitada, durante 60 días calendario contados a partir de la fecha de su expedición.

CON FUNDAMENTO EN LA MATRÍCULA E INSCRIPCIONES EFECTUADAS EN EL REGISTRO MERCANTIL, LA CÁMARA DE COMERCIO CERTIFICA:

NOMBRE, IDENTIFICACIÓN Y DOMICILIO

Razón social: WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS S.A.S.
Nit: 830029907 2
Domicilio principal: Bogotá D.C.

MATRÍCULA

Matrícula No. 00783826
Fecha de matrícula: 21 de abril de 1997
Último año renovado: 2025
Fecha de renovación: 17 de marzo de 2025

UBICACIÓN

Dirección del domicilio principal: Avenida Carrera 7 113 43 Oficina 806
Municipio: Bogotá D.C.
Correo electrónico: sclavijo@wolfmendez.com
Teléfono comercial 1: 6017435199
Teléfono comercial 2: 3212087546
Teléfono comercial 3: No reportó.

Dirección para notificación judicial: Avenida Carrera 7 113 43 Oficina 806
Municipio: Bogotá D.C.
Correo electrónico de notificación: sclavijo@wolfmendez.com
Teléfono para notificación 1: 6017435199
Teléfono para notificación 2: 3212087546
Teléfono para notificación 3: No reportó.

La persona jurídica NO autorizó para recibir notificaciones personales a través de correo electrónico, de conformidad con lo establecido en los artículos 291 del Código General del Procesos y 67 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso

Mario Fernando Ávila Cristancho

Administrativo.

CONSTITUCIÓN

E.P. No. 775, Notaría 36 de Santafé de Bogotá, del 4 de marzo de 1.997, inscrita el 18 de abril de 1.997 bajo el número 581.712 del Libro IX, se constituyó la sociedad comercial de nominada: WOLF ABOGADOS ASOCIADOS LTDA.

REFORMAS ESPECIALES

Por Escritura Pública No. 4873 del 20 de octubre de 2008 de la Notaría treinta y seis de Bogotá D.C., inscrita el 29 de octubre de 2008 bajo el número 01252623 del Libro IX, la sociedad cambio su nombre de: WOLF ABOGADOS ASOCIADOS LTDA, por el de: WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA.

Por Acta No. 24 de la Junta de Socios, del 17 de mayo de 2017, inscrita el 26 de mayo de 2017 bajo el número 02228351 del Libro IX, la sociedad de la referencia cambio su nombre de WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA por el de: WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS S.A.S.

Por Acta No. 24 de la Junta de Socios, del 17 de mayo de 2017, inscrita el 26 de mayo de 2017 bajo el número 02228351 del Libro IX, la sociedad de la referencia se transformó de Sociedad Limitada a Sociedad por Acciones Simplificada bajo el nombre de: WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS S.A.S.

TÉRMINO DE DURACIÓN

La persona jurídica no se encuentra disuelta y su duración es hasta el 4 de marzo de 2037.

OBJETO SOCIAL

La sociedad tendrá como objeto principal las siguientes actividades: A) La prestación de servicios legales, asesoría, representación y mandato, relacionados con el mundo del derecho o con otras profesiones liberales directamente o a través de la contratación de terceros profesionales independientes; B) Adquirir o representar marcas, patentes, procedimientos de fabricación y comercialización de productos y servicios de empresas nacionales o extranjeras, para comercializar directamente o por medio de terceros; C) La compra, venta, negociación y administración de acciones, cuotas o partes de interés social en sociedades de cualquier naturaleza; D) La compra, venta, negociación y administración de bienes inmuebles urbanos o rurales; E) En general, la celebración de todos los actos o contratos sobre bienes muebles o inmuebles que se relacionen directamente con el objeto social antes anunciado. En general, la sociedad se entiende autorizada por sus accionistas para realizar cualquier otra actividad económica lícita, tanto en Colombia como en el extranjero, así como celebrar cualquier tipo de contrato comercial o de naturaleza diversa, cuya motivación y objeto se enmarquen en la licitud y las buenas costumbres comerciales.

CAPITAL

* CAPITAL AUTORIZADO *

Valor : $10.000.000.000,00
No. de acciones : 1.000.000,00
Valor nominal : $10.000,00

* CAPITAL SUSCRITO *

Valor : $102.840.000,00
No. de acciones : 10.284,00
Valor nominal : $10.000,00

* CAPITAL PAGADO *

Valor : $102.840.000,00
No. de acciones : 10.284,00
Valor nominal : $10.000,00

REPRESENTACIÓN LEGAL

La representación legal de la sociedad estará a cargo de una persona natural, accionista o no, que se denominará Gerente, quien podrá tener uno o más suplentes, designados por la Asamblea General de Accionistas.

FACULTADES Y LIMITACIONES DEL REPRESENTANTE LEGAL

La sociedad será gerencia da, administrada y representada legalmente ante terceros por el Gerente, quien no tendrá restricciones de contratación por razón de la naturaleza ni de la cuantía de los actos que celebre. Por lo tanto, se entenderá que el Gerente podrá celebrar o ejecutar todos los actos y contratos comprendidos en el objeto social o que se relacionen directa o indirectamente con la existencia y el funcionamiento de la sociedad. El Gerente, por ende, se entenderá investido de los más amplios poderes para actuar en todas las circunstancias en nombre de la sociedad, con excepción de aquellas facultades que, de acuerdo con los estatutos, se hubieren reservado los accionistas. En las relaciones frente a terceros, la sociedad quedará obligada por los actos y contratos celebrados por el Gerente en su calidad de representante legal. Las atribuciones de los representantes legales suplentes serán las mismas predicables del Gerente y representante legal principal y actuarán en sus faltas temporales o absolutas.

NOMBRAMIENTOS

REPRESENTANTES LEGALES

Por Acta No. 31 del 29 de noviembre de 2022, de Asamblea de Accionistas, inscrita en esta Cámara de Comercio el 28 de diciembre de 2022 con el No. 02915323 del Libro IX, se designó a:

CARGO	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
Gerente	Jesus Maria Mendez Bermudez	C.C. No. 13491525

CARGO	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
Suplente Del Gerente	Sandra Clavijo Olarte	C.C. No. 52556679

REVISORES FISCALES

Por Acta No. 33 del 6 de febrero de 2023, de Accionista Único, inscrita en esta Cámara de Comercio el 13 de febrero de 2023 con el No. 02933556 del Libro IX, se designó a:

CARGO	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
Revisor Fiscal Persona Juridica	TRIBUTAR INTERNATIONAL AUDIT SAS	N.I.T. No. 901394719 5

Por Documento Privado del 16 de octubre de 2025, de Revisor Fiscal, inscrita en esta Cámara de Comercio el 20 de octubre de 2025 con el No. 03308227 del Libro IX, se designó a:

CARGO	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
Revisor Fiscal Principal	Milena Marcela Tinoco Diaz	C.C. No. 52914338 T.P. No. 163652-T

Por Documento Privado del 4 de febrero de 2025, de Revisor Fiscal, inscrita en esta Cámara de Comercio el 7 de febrero de 2025 con el No. 03205065 del Libro IX, se designó a:

CARGO	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
Revisor Fiscal Suplente	Luis Leonardo Martinez Higuera	C.C. No. 80895687 T.P. No. 181625-t

REFORMAS DE ESTATUTOS

Los estatutos de la sociedad han sido reformados así:

DOCUMENTO	INSCRIPCIÓN

E. P. No. 0004873 del 20 de octubre de 2008 de la Notaría 36 de Bogotá D.C.	01252623 del 29 de octubre de 2008 del Libro IX
E. P. No. 824 del 17 de marzo de 2017 de la Notaría 11 de Bogotá D.C.	02197422 del 21 de marzo de 2017 del Libro IX
Acta No. 24 del 17 de mayo de 2017 de la Junta de Socios	02228351 del 26 de mayo de 2017 del Libro IX
Acta No. 31 del 2 de mayo de 2022 de la Asamblea de Accionistas	02947182 del 21 de marzo de 2023 del Libro IX

RECURSOS CONTRA LOS ACTOS DE INSCRIPCIÓN

De conformidad con lo establecido en el Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo y la Ley 962 de 2005, los actos administrativos de registro, quedan en firme dentro de los diez (10) días hábiles siguientes a la fecha de inscripción, siempre que no sean objeto de recursos. Para estos efectos, se informa que para la Cámara de Comercio de Bogotá, los sábados NO son días hábiles.

Una vez interpuestos los recursos, los actos administrativos recurridos quedan en efecto suspensivo, hasta tanto los mismos sean resueltos, conforme lo prevé el artículo 79 del Código de Procedimiento Administrativo y de los Contencioso Administrativo.

A la fecha y hora de expedición de este certificado, NO se encuentra en curso ningún recurso.

CLASIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ECONÓMICAS - CIIU

Actividad principal Código CIIU: 6910
Actividad secundaria Código CIIU: 6820

TAMAÑO EMPRESARIAL

De conformidad con lo previsto en el artículo 2.2.1.13.2.1 del Decreto 1074 de 2015 y la Resolución 2225 de 2019 del DANE el tamaño

de la empresa es Mediana

Lo anterior de acuerdo a la información reportada por el matriculado o inscrito en el formulario RUES:

Ingresos por actividad ordinaria $ 8.278.275.101

Actividad económica por la que percibió mayores ingresos en el período - CIIU : 6910

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Que, los datos del empresario y/o el establecimiento de comercio han sido puestos a disposición de la Policía Nacional a través de la consulta a la base de datos del RUES.

Los siguientes datos sobre RIT y Planeación son informativos: Contribuyente inscrito en el registro RIT de la Dirección de Impuestos, fecha de inscripción : 14 de octubre de 2022. Fecha de envío de información a Planeación : 20 de octubre de 2025. \n \n Señor empresario, si su empresa tiene activos inferiores a 30.000 SMLMV y una planta de personal de menos de 200 trabajadores, usted tiene derecho a recibir un descuento en el pago de los parafiscales de 75% en el primer año de constitución de su empresa, de 50% en el segundo año y de 25% en el tercer año. Ley 590 de 2000 y Decreto 525 de 2009. Recuerde ingresar a www.supersociedades.gov.co para verificar si su empresa está obligada a remitir estados financieros. Evite sanciones.

El presente certificado no constituye permiso de funcionamiento en ningún caso.

****

Este certificado refleja la situación jurídica registral de la sociedad, a la fecha y hora de su expedición.

****

Este certificado fue generado electrónicamente con firma digital y cuenta con plena validez jurídica conforme a la Ley 527 de 1999.

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACIÓN LEGAL

Fecha Expedición: 21 de octubre de 2025 Hora: 11:12:23
Recibo No. AB25607741
Valor: $ 11,600

CÓDIGO DE VERIFICACIÓN B2560774198E91

Verifique el contenido y confiabilidad de este certificado, ingresando a www.ccb.org.co/certificadoselectronicos y digite el respectivo código, para que visualice la imagen generada al momento de su expedición. La verificación se puede realizar de manera ilimitada, durante 60 días calendario contados a partir de la fecha de su expedición.

****

Firma mecánica de conformidad con el Decreto 2150 de 1995 y la autorización impartida por la Superintendencia de Industria y Comercio, mediante el oficio del 18 de noviembre de 1996.

MARIO FERNANDO AVILA CRISTANCHO