

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 907**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2017 PCT/EP2017/050718**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2017 E 17701812 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025 EP 3402822**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo y fármaco específicos de AXL para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

13.01.2016 US 201662278283 P
08.07.2016 WO PCT/EP2016/066353

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.06.2025

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.00%)
Carl Jacobsens Vej 30
2500 Valby, DK

72 Inventor/es:

BOSHUIZEN, JULIA;
BREIJ, ESTHER;
KOOPMAN, LOUISE;
SATIJN, DAVID;
VAN DEN BRINK, EDWARD;
VERZIJL, DENNIS;
DE JONG, ROB;
VAN DIJKHUIZEN RADERSMA, RIEMKE;
PEEPER, DANIEL y
PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 3 029 907 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpo y fármaco específicos de AXL para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) que se unen a la AXL humana para su uso con fines terapéuticos, en particular para el tratamiento del melanoma junto con al menos un agente terapéutico.

10 **Antecedentes de la invención**

La AXL es una proteína transmembrana de 104-140 kDa que pertenece a la subfamilia TAM (*Tyro-Axl-Mer*) de Tirosina Cinasas Receptoras (RTK, *Receptor Tyrosine Kinases*) de mamífero y que tiene capacidades transformadoras (Paccez *et al.*, 2014). Se ha notificado una expresión aumentada o *de novo* de AXL en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer gástrico, de próstata, de ovario y pulmón (Paccez *et al.*, 2014). Cabe destacar que, varios tipos de cáncer con resistencia a inhibidores de tirosina cinasa, a inhibidores de serina/treonina cinasa y/o a la quimioterapia, han mostrado una expresión aumentada o *de novo* de la proteína AXL (Wilson *et al.*, 2014; Brand *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012; Blakely *et al.*, 2012). En particular, células de melanoma resistentes a inhibidores de las serina/treonina cinasas B-raf (BRAF), MEK y ERK (siendo MEK también una tirosina cinasa), mostraron expresión de AXL aumentada o *de novo* (Muller *et al.*, 2014; Konieczkowski *et al.*, 2014). BRAF, MEK y ERK forman parte de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, siglas del inglés). La mayoría de los melanomas malignos llevan mutaciones oncogénicas en BRAF o NRAS, lo que puede dar lugar a una vía de MAPK constitutivamente activa (Sullivan *et al.*, 2016).

El dominio extracelular de AXL se compone de una combinación de dos dominios aminoterminales de tipo inmunoglobulina (Ig) (dominios Ig1 e Ig2) distales a la membrana y dos repeticiones de fibronectina de tipo III (FNIII) proximales a la membrana (dominios FN1 y FN2) (Paccez *et al.*, 2014). AXL puede activarse después de unirse a su ligando, el factor 6 específico de la detención del crecimiento (Gas6, *growth arrest-specific factor 6*) dependiente de la vitamina K. La unión de Gas6 a AXL conduce a la dimerización, autofosforilación y posterior activación de vías de señalización intracelular de AXL, tales como las cascadas de PI3K/AKT, de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), STAT y NF-κB (Leconet *et al.*, 2013). En las células cancerosas, la expresión de AXL se ha asociado a la motilidad, invasión, migración de las células tumorales, y está implicada en la transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-to-mesenchymal*) (Linger *et al.*, 2010). Se han descrito anticuerpos contra AXL que atenúan el crecimiento de xenoinjertos de NSCLC y de cáncer de mama *in vivo* a través de la regulación por disminución de la expresión del receptor, reduciendo la proliferación de células tumorales e induciendo la apoptosis (Li *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010; documento WO 2011/159980, Genentech). También se han descrito otros anticuerpos contra AXL (Leconet *et al.*, 2013; Iida *et al.*, 2014; documento WO 2012/175691, INSERM; documento WO 2012/175692, INSERM; documento WO 2013/064685, Pierre Fabre Medicaments; documento WO 2013/090776, INSERM; documento WO 2009/063965, Chugai Pharmaceuticals, documentos WO 2010/131733 y WO 2016/005593), incluido un CAF basado en un anticuerpo contra AXL y un dímero de pirrolobenzo-diazepina (PBD) (documento WO 2014/174111, Pierre Fabre Medicament y Spirogen Sarl).

Breij *et al.*, American Association of cancer research, resumen, páginas 1-2, 2015, describen el uso de conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) contra Axl para tratar el cáncer de pulmón y el carcinoma epidermoide. Los anticuerpos contra Axl se conjugaron con MMAE (monometilauristatina E).

Breij *et al.*, Journal of clinical oncology, vol. 33, páginas 1-2, resumen 2015, describen el uso de CAF contra Axl conjugado con MMAE destruyendo eficazmente células de cáncer de pulmón *in vivo*.

En el documento WO 2014/068139 se describen los anticuerpos 1003A2 y 1024G11 contra Axl y su conjugación con saporina para destruir diversas líneas de células tumorales.

En el documento WO 2016/005593 se describen anticuerpos inhibidores contra Axl que inhiben el crecimiento tumoral y no compiten con el ligando GAS6 para unirse a Axl y su uso como CAF con MMAE para eliminar varios tipos de cáncer *in vivo*, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma cervicouterino, cáncer de esófago, carcinoma epidermoide y cáncer de páncreas.

En el documento WO 2015/193430 se describen anticuerpos contra Axl y CAF de los mismos, para su uso en el tratamiento de cánceres tales como melanomas junto con otros quimioterápicos, tal como sorafenib.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de perfeccionar los métodos basados en CAF contra AXL para el tratamiento del melanoma, en particular en vista de la resistencia a los inhibidores de MAPK.

Sumario de la invención

El(los) presente(s) inventor(es) ha(n) descubierto que los CAF basados en anticuerpos contra AXL (también

denominados en el presente documento "CAF-AXL") pueden usarse para tratar eficazmente el melanoma junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, para su uso en el tratamiento de un melanoma junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK, seleccionado de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK, o una combinación de dos o más de los mismos. El CAF y el uno o más inhibidores pueden, por ejemplo, administrarse de manera simultánea, por separado o de manera secuencial.

Este aspecto de la invención y otros aspectos y realizaciones, incluido el uso de los CAF-AXL basados en anticuerpos contra AXL caracterizados por sus propiedades de unión a antígeno o - secuencias, residuos terapéuticos adecuados para dichos CAF, combinaciones de dichos CAF con ciertos inhibidores, y métodos relacionados para tratar el melanoma, se describen con más detalle a continuación. De hecho, todos y cada uno de los aspectos o realizaciones que se refieran a un CAF-AXL para su uso en el tratamiento del melanoma junto con uno o más inhibidores de acuerdo con la invención, son también aplicables como un aspecto

o realización que se refiera a un método de tratamiento del melanoma mediante la administración de un CAF-AXL y uno o más inhibidores, y viceversa. Así mismo, cualquier CAF-AXL como se ha definido en cualquier aspecto o realización en el presente documento, puede usarse junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., inhibidores de serina/treonina cinasa, como se describe en el presente documento.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Curvas de unión de anticuerpos contra AXL en células HEK293 transfectadas con (A) el ECD (*extracellular domain*)-AXL humana (dominio extracelular de AXL humana), (B) el ECD-AXL de macaco cangrejero o (C) el ECD-AXL de ratón. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia media (IFM) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 2: La unión de anticuerpos contra AXL a quimeras de AXL de ratón-humano se realizó como se describe en el Ejemplo 3. Se analizaron las siguientes proteínas quiméricas de AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y de AXL de *Mus musculus* (mmAXL): (A) hsAXL y simulación, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIg1, (D) hsAXL-mmIg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

Figura 3: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos contra AXL en células A431. La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos contra AXL en células A431 se determinó como se describe en el Ejemplo 4.

Figura 4: Características de unión de los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL (CAF-AXL). La unión de los CAF-AXL en células HEK293T transfectadas transitoriamente con la AXL humana se determinó como se describe en el Ejemplo 5. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia media (IFM) de un experimento representativo.

Figura 5: Citotoxicidad *in vitro* inducida por conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL. La inducción de citotoxicidad por los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL se determinó como se explica en el Ejemplo 6.

Figura 6: Variantes de VH (cadena pesada) y VL (cadena ligera) de anticuerpos que permiten la unión a AXL. Se alinearon anticuerpos con idénticas regiones VL o VH y se determinaron las diferencias de las secuencias de VH (Figuras A-D) o de VL (Figura E), respectivamente, se identificaron e indicaron con recuadros en las figuras. Las regiones CDR (regiones determinantes de complementariedad) se indican subrayadas.

Figura 7: La inducción de citotoxicidad por los CAF en células LCLC-103H se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

Figura 8: Actividad antitumoral de los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo terapéutico de xenoinjerto de LCLC-103H como se describe en el Ejemplo 9.

Figura 9: Tinción inmunohistoquímica de secciones tumorales congeladas de PAXF1657 (modelo de PDX (*patient-derived xenograft*, xenoinjerto derivado de un paciente) de cáncer de páncreas)) usando un conjunto de anticuerpos monoclonales contra AXL como se describe en el Ejemplo 10.

Figura 10: (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con los CAF contra AXL el modelo PAXF1657. Un HuMab (*human monoclonal antibody*, anticuerpo monoclonal humano) contra AXL no conjugado (C) y un CAF no dirigido (D) no muestran actividad antitumoral, lo que indica que la capacidad terapéutica de los CAF contra AXL dependía de la actividad citotóxica de MMAE y de la unión a la diana, las barras de error representan el S.E.M (*standard error of the mean*, error estándar de la media).

Figura 11: La unión de los anticuerpos contra AXL a quimeras de AXL de ratón-humano se realizó como se describe

en el Ejemplo 11. Se analizaron las siguientes proteínas quiméricas AXL de *Homo sapiens* (hsAXL) y de AXL de *Mus musculus* (mmAXL): (A) hsAXL y simulación, (B) hsAXL-mmECD, (C) hsAXL-mmIg1, (D) hsAXL-mmIg2, (E) hsAXL-mmFN1, (F) hsAXL-mmFN2.

5 **Figura 12:** Unión de Gas6 humano (hGas6) en células A431 que se habían preincubado con anticuerpos de unión al dominio Ig1 de AXL. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia media (IFM) de un experimento representativo.

10 **Figura 13:** Actividad antitumoral de los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo terapéutico de xenoinjerto A431, que produce niveles altos de Gas6 endógeno, como se describe en el Ejemplo 13. Los paneles A y B muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

15 **Figura 14:** Actividad antitumoral de los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en un modelo terapéutico de xenoinjerto LCLC-103H, que expresa niveles bajos de Gas6 endógeno, como se describe en el Ejemplo 13. Los paneles A y B muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

Figura 15: La inducción de citotoxicidad por los CAF-AXL en células A431 (A) y MDA-MB231 (B), se determinó como se describe en el Ejemplo 8.

20 **Figura 16.** Tinción con AXL en cáncer tiroideo, esofágico, de ovario, de mama, de pulmón, pancreático, cervicouterino y de endometrio. La intensidad de tinción promedio con AXL (DO) de las células positivas a tinción con AXL, se representa en el eje X, y el porcentaje de células tumorales positivas a tinción con AXL se representa en el eje Y. Cada punto representa un núcleo tumoral, procedente de un paciente individual.

25 **Figura 17.** Ejemplos representativos de núcleos tumorales inmunoteñidos con AXL de diferentes indicios tumorales.

30 **Figura 18.** Los anticuerpos AXL se unen específicamente a AXL pero no a otros miembros de la familia de receptores TAM. Unión de anticuerpos HuMab-AXL a células HEK293 transfectadas con AXL humana (A), MER humana (B), TIRO3 humana (C), o a células HEK293 no transfectadas (D). Para confirmar la correcta expresión de las células transfectadas, células HEK293F no transfectadas y células transfectadas con AXL (E), MER (F) o TIRO3 (G), se tiñeron con anticuerpos específicos contra MER y TIRO3. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia media (IFM) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 15.

35 **Figura 19.** Detección de anticuerpos contra AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales que se habían incubado con anticuerpos contra AXL durante 1 hora a 4 °C, seguido de una incubación de una noche a 4 °C o 37 °C. Tanto en células MDA-MB-231 (A y B) como en células Calu-1 (C y D), se detectó más anticuerpo en la membrana plasmática de las células que se habían incubado a 4 °C que en las células que se habían incubado a 37 °C, lo que ilustra la internalización del anticuerpo unido a la membrana a 37 °C.

40 **Figura 20.** Intensidad de fluorescencia media geométrica de células LCLC-103H después de su incubación con anticuerpos contra AXL que habían formado un complejo con Fab-TAMRA/QSY7. Como controles negativos se incluyeron IgG1-b12 y Fab-TAMRA/QSY7 en solitario.

45 **Figura 21.** Expresión de AXL en líneas celulares de melanoma establecidas y en líneas de melanoma primario de bajo pase derivadas de pacientes (PDX). (A) Se observaron niveles variables de expresión de AXL en líneas celulares de melanoma establecidas. Se observó expresión de AXL aumentada o *de novo* en las líneas celulares resistentes a PLX4720 (A375-R, SKMEL28R, SKMEL147). (B) Se observó expresión de AXL en 8/15 líneas de melanoma primario derivadas de pacientes. Tanto en líneas celulares de melanoma establecidas como en cultivos de PDX de bajo pase, la expresión de AXL estaba inversamente correlacionada con la expresión de MITF (*melanocyte inducing transcription factor*, factor de transcripción inductor de melanocitos).

50 **Figura 22.** Expresión de la proteína AXL en la superficie celular. Ejemplos de expresión de AXL determinada por citometría de flujo cuantitativa en una línea celular de melanoma negativa a tinción con Axl y en otra positiva a tinción con Axl. Los gráficos en gris claro representan la tinción con anticuerpos específicos contra AXL, mientras que los gráficos en gris oscuro representan la tinción con el anticuerpo de control de isotipo.

55 **Figura 23.** Sensibilidad de líneas celulares de melanoma establecidas a IgG1-AXL-107-vcMMAE. Líneas celulares de melanoma (A-F; CDX) se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE o con el control de isotipo CAF IgG1-b12-vcMMAE durante 5 días por triplicado. La viabilidad celular se evaluó con un ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo y se representó gráficamente frente a la concentración del CAF.

60 **Figura 24.** Sensibilidad de cultivos celulares primarios de melanoma a IgG1-AXL-107-vcMMAE. Líneas celulares de melanoma primario de bajo pase (A-C; PDX) se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE o con el control de isotipo CAF IgG1-b12-vcMMAE durante 8 días por triplicado. La viabilidad celular se evaluó con un ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo y se representó gráficamente frente a la concentración del CAF.

Figura 25. Eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de melanoma SKMEL147. Se muestra el tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE, IgG1-AXL-107 o IgG1-AXL-107-vcMMAE (A). Se muestra el tamaño del tumor que se observó de los ratones tratados con IgG1-AXL-107-vcMMAE (n=2) o de los tratados de nuevo con IgG1-AXL-107-vcMMAE (n=4) (B).

Figura 26. Células SKMEL28 de tipo natural (color rojo) y células SKMEL28-R resistentes a PLX4720 (color verde) se mezclaron a una proporción de 1:1 y se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE (CAF-AXL), IgG1-b12-MMAE (b12-CAF), PLX4720 (PLX), dabrafenib (dabr), trametinib (tram) o con las combinaciones indicadas. (A) Número total de células en relación con las células no tratadas. (B) Relación de GFP/mCherry correspondiente a la relación de células SKMEL28-R/SKMEL28.

Figura 27. Ejemplos de expresión de Axl detectada mediante inmunohistoquímica en muestras de melanoma primario. (A) Ejemplo de melanoma con intensidad de tinción con Axl positiva +++ (B) Ejemplo de melanoma con intensidad de tinción con Axl positiva entre + y ++ (C) Ejemplo de expresión de Axl en tejidos de melanoma del mismo paciente antes y después del tratamiento con vemurafenib; parte izquierda = antes de tratamiento con vemurafenib, intensidad de tinción con Axl débilmente +; parte derecha = después de tratamiento con vemurafenib, intensidad de tinción con Axl débilmente + a ++ (D) Ejemplo de expresión heterogénea de Axl con intensidad ++ dentro de tejido de melanoma primario.

Figura 28. Efecto terapéutico de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto de melanoma M019R, que se describe en los Ejemplos 18 y 19. (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-b12-vcMMAE o dabrafenib y trametinib. (B) Tamaño del tumor en ratones individuales el día 33 después de la inoculación de las células tumorales. ****, $p < 0,0001$. (C) Gráfico de Kaplan-Meier de los grupos que volvieron a tratarse con la combinación de dabrafenib y trametinib (dab/tram), IgG1-AXL-107-vcMMAE, o la triple combinación de dab/tram y IgG1-AXL-107-vcMMAE después del tratamiento inicial con dab/tram durante 30 días, según se indique.

Figura 29. Efecto terapéutico de IgG1-AXL-107-vcMMAE en el modelo de xenoinjerto de melanoma M009R, que se describe en los Ejemplos 18 y 20. (A) Tamaño promedio del tumor después del tratamiento terapéutico con IgG1-b12-vcMMAE (CAF de control), IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-b12-vcMMAE más dabrafenib y trametinib, o IgG1-AXL-107-vcMMAE más dabrafenib y trametinib. (B) Tamaño del tumor en ratones individuales el día 14 después del primer tratamiento. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 30. Citotoxicidad *in vitro* inducida por IgG1-AXL-107-vcMMAE en líneas celulares de melanoma mutante-NRAS. La inducción de citotoxicidad por los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL se determinó como se explica en el Ejemplo 21.

Figura 31. La expresión de Axl en tejidos de melanoma mutante-NRAS (melanoma causado por mutaciones en el gen NRAS) se determinó mediante inmunohistoquímica. La puntuación H de cada muestra se calculó en función del porcentaje de células tumorales positivas a tinción con Axl y de la intensidad de la tinción (1+, 2+, 3+) de células tumorales positivas a tinción con Axl, como se describe en el Ejemplo 22.

Divulgación detallada de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que, en modelos tumorales *in vivo* de melanoma resistente a inhibidores de BRAF, una triple combinación de CAF-AXL, de un inhibidor de BRAF (dabrafenib) y de un inhibidor de MEK (trametinib), fue más eficaz que, p. ej., solo CAF-AXL, sólo la combinación de los inhibidores de BRAF y MEK (Ejemplo 19), o una combinación de los inhibidores de BRAF y MEK con un CAF de control (Ejemplo 20). Este fue el caso incluso cuando el modelo de melanoma era insensible al tratamiento con el conjugado de anticuerpo y fármaco contra AXL (CAF-AXL) como agente único *in vitro* (a 1 µg/ml) o *in vivo* (Ejemplo 20). Además, estudios realizados *in vitro* de mezclas de células de melanoma sensibles a inhibidores de BRAF y células de melanoma resistentes a un inhibidor de BRAF (PLX4720) mostraron que las combinaciones de CAF-AXL y de un inhibidor de BRAF (PLX4720 o dabrafenib) o una combinación triple de CAF-AXL, de inhibidor de BRAF (dabrafenib) y de inhibidor de MEK (trametinib), erradicaron tanto las células sensibles al inhibidor de BRAF como las resistentes al mismo (Ejemplo 17). Por último, en 9 de 10 muestras de tumores de pacientes con melanoma avanzado con mutación en NRAS (melanoma causado por mutaciones en el gen NRAS), se detectó expresión de AXL en al menos un subconjunto de las células tumorales (Ejemplo 22).

Estos y otros resultados notificados en el presente documento indican que las combinaciones de CAF-AXL y de uno o más inhibidores de cinasas de la vía MAPK, p. ej., inhibidores de cinasas tales como BRAF, MEK y ERK, son adecuados para el tratamiento del melanoma.

Aplicaciones terapéuticas

La invención proporciona un CAF-AXL, p. ej., HuMax-CAF-AXL (conjugado de anticuerpo y fármaco contra AXL (CAF-AXL) completamente humanizado (HuMax), para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con uno o

más inhibidores de la vía MAPK, seleccionado de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK, y una combinación de un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK. El CAF-AXL y el inhibidor o inhibidores pueden administrarse de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. Normalmente, sin embargo, se administran por separado, según diferentes pautas posológicas. En el presente documento se describen ejemplos pautas posológicas. Sin embargo, basándose en la presente divulgación y en el nivel del experto en la materia, el experto, p. ej., un médico, puede contemplar e implementar otras pautas posológicas adecuadas.

Un "inhibidor de la vía de las MAP cinasas" (vía de las proteína cinasas activadas por mitógenos), "inhibidor de la vía MAPK", "un inhibidor de la vía MAPK" o "inhibidor de MAPK", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto, normalmente un compuesto farmacéutico, que inhibe al menos una enzima de la vía MAPK, causando el bloqueo de su actividad serina/treonina/tirosina cinasa. La vía MAPK es una vía de señalización intracelular muy conocida, que consiste en una serie de proteínas que comunican una señal desde un receptor de tirosina cinasa en la superficie de la célula hasta el ADN en el núcleo de la misma. La activación de la vía implica la posterior fosforilación de diversas serina/treonina/tirosina cinasas. Generalmente se denominan MAPKKK (p. ej., RAF), MAPKK (p. ej., MEK) y MAPK (p. ej., ERK). La familia de las proteína cinasas RAF incluye las serina/treonina cinasas A-RAF, B-RAF (BRAF) y C-RAF, que comparten RAS como activador anterior (*upstream*) común. MEK1 y MEK2 son cinasas de doble especificidad, que catalizan la fosforilación tanto de tirosina como de treonina, p. ej., en ERK1 y ERK2. A su vez, ERK1 y ERK2, catalizan la fosforilación de sustratos citoplasmáticos y nucleares. Se conocen y/o están en fase de desarrollo clínico, inhibidores de una o más enzimas de la vía MAPK para el tratamiento del melanoma y otras neoplasias malignas (véase, p. ej., la Tabla 1 y las referencias citadas en ella). Los ejemplos de inhibidores de la vía MAPK se exponen en la Tabla 1, e incluyen inhibidores de las serina/treonina/tirosina cinasas BRAF, MEK y ERK.

Un "inhibidor de serina/treonina cinasa" o "S/Th KI", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto, normalmente un fármaco, que inhibe al menos la actividad serina/treonina cinasa de una serina/treonina/tirosina cinasa tal como BRAF, MEK o ERK. Las serina/treonina cinasas son enzimas responsables de la fosforilación del grupo hidroxilo de un resto de serina o de treonina, una etapa que inhibe los S/Th KI, ya sea directa o indirectamente. La fosforilación de las serinas o treoninas provoca la activación de cascadas de transducción de señales intracelulares. Ejemplos de S/Th KI útiles para la terapia del cáncer, y sus dianas, se muestran más adelante en la Tabla 1, e incluyen inhibidores de BRAF tales como vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib y análogos o derivados de los mismos e inhibidores de MEK tales como trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib y análogos y derivados de los mismos. En una realización, la expresión "inhibidor de serina/treonina cinasa", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe específicamente la actividad de fosforilación de proteína de una serina/treonina cinasa, p. ej., la actividad serina/treonina quinasa de MEK, ERK, BRAF y/o de sus mutantes (p. ej., con una mutación V600 en el gen BRAF).

Un "inhibidor de serina/treonina/tirosina cinasa" o "S/Th/T KI" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto, normalmente un fármaco, que inhibe una o ambas de las actividades serina/treonina y tirosina cinasa de una cinasa que tiene ambos tipos de actividad cinasa, tal como MEK.

Como se utiliza en el presente documento, un "inhibidor de BRAF" o "BRAFi" es un inhibidor de la actividad serina/treonina cinasa de BRAF humano (UniProtKB - P15056 (BRAF_HUMAN)), opcionalmente también de un mutante del mismo y/o de una isoforma del mismo. En una realización, el inhibidor de BRAF inhibe la actividad serina/treonina cinasa de uno o más mutantes de BRAF humano, tal como los que tiene una mutación en el resto V600, L597 o K601, tal como V600E. Por ejemplo, un BRAFi pueden inhibir la actividad serina/treonina cinasa del BRAFi mutante de una manera más eficaz de la que inhiben el BRAF humano natural, siendo así selectivos del BRAF mutante (también denominado en el presente documento "mutBRAFi"). En otra realización, el inhibidor de BRAF inhibe la actividad serina/treonina cinasa de uno o ambos de A-RAF (UniProtKB P10398 (ARAF_HUMAN)) y C-RAF (UniProtKB P04049 (RAF1_HUMAN)) y/o de sus mutantes (también denominado en el presente documento "inhibidor de RAF" o "inhibidor Pan-RAF" o "Pan-RAFi"). En la Tabla 1 se enumeran ejemplos preferidos, pero no limitativos, de inhibidores de BRAF.

Como se utiliza en el presente documento, un "inhibidor de MEK" o "MEKi" como se utiliza en el presente documento es un inhibidor de al menos la actividad serina/treonina cinasa, la actividad tirosina quinasa, o ambas, de MEK1 (UniProtKB Q02750 (MP2K1_HUMAN)), MEK2 (UniProtKB P36507 (MP2K2_HUMAN)) o ambas, y puede inhibir también o alternativamente otras proteínas MEK, tal como MEK5 (UniProtKB Q13163 (MP2K5_HUMAN)). A menos que el contexto lo contradiga, cuando en el presente documento se hace referencia a un inhibidor de serina/treonina cinasa o S/Th KI de MEK, opcionalmente, el inhibidor también puede inhibir la actividad tirosina cinasa de MEK. Preferentemente, un inhibidor de MEK inhibe la actividad serina/treonina cinasa de MEK1, MEK2 o ambas. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos preferidos, pero no limitativos, de inhibidores de BRAF.

Como se utiliza en el presente documento, un "inhibidor de ERK", como se utiliza en el presente documento, es un inhibidor de la actividad serina/treonina cinasa de ERK1 [UniProtKB P27361 (MK03_HUMAN)], ERK2 (UniProtKB P28482 (MK01_HUMAN)) o de ambas. Un inhibidor de ERK puede inhibir específicamente uno o más de ERK1 y ERK2, y puede también o alternativamente inhibir específicamente otras isoformas de ERK. Preferentemente, un ERKi inhibe la actividad serina/treonina cinasa de al menos una de las ERK1 y ERK2. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos preferidos, pero no limitativos, de inhibidores de ERK.

Tabla 1 - Ejemplos de inhibidores de la vía MAPK

Fármaco	Diana(s) principal (es) (CI ₅₀)
Vemurafenib (PLX4032) (N-[3-[[5-(4-clorofenil)-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-il]carbonil]-2,4-difluorofenil)-1-propansulfonamida)	B-Raf (V600E) (31 nM) C-Raf (48 nM) MAP4K5 (KHS1) (51 nM) B-Raf (100 nM) (Bollag <i>et al.</i> , 2010)
PLX4720* (N-(3-(5-cloro-1H-pirrol-2,3-b]piridin-3-carbonil)-2,4-difluorofenil)propano-1-sulfonamida)	B-Raf (V600E) (13 nM) C-Raf-1 (Y340D/Y341D) (6,7 nM) B-Raf (160 nM) (Bollag <i>et al.</i> , 2010)
Dabrafenib (GSK2118436) (N-(3-(5-(2-aminopirimidin-4-il)-2-terc-butiltiazol-4-il)-2-fluorofenil)-2,6-difluorobenzenosulfonamida)	B-Raf (V600E) (0,8 nM) C-Raf (5,0 nM) B-Raf (3,2 nM) (Hong <i>et al.</i> , 2012, Laguerre <i>et al.</i> , 2009)
Encorafenib (LGX818) (éster metílico del ácido N-[(1S)-2-[[4-[3-[5-cloro-2-fluoro-3-[(metilsulfonil)aminofenil]-1-(1-metiletil)-1H-pirazol-4-il]-2-pirimidinil]amino]-1-metiletil]carbámico)	B-Raf (V600E) (CE ₅₀ 4 nM) (Stuart <i>et al.</i> , 2012)
Sorafenib (BAY 43-9006) (4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida)	Raf-1 (6 nM) B-Raf (22 nM) B-Raf (V599E) (38 nM) (Wilhelm <i>et al.</i> , 2004)
GDC-0879 (oxima de (E)-5-(1-(2-hidroxietil)-3-(piridin-4-il)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidroinden-1-ona)	BRAF (0,13 nM) C-Raf (Wong <i>et al.</i> , 2009)
RAF265 (CHIR-265) (1-metil-5-[2-[5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]piridin-4-il]oxi-N-[4-(trifluorometil)fenil] benzimidazol-2-amina)	C-Raf/BRAF/BRAF V600E (3-60 nM) (Mordant <i>et al.</i> , 2010)
SB590885 (oxima de (E)-5-(2-(4-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-4-(piridin-4-il)-1H-imidazol-5-il)-2,3-dihidroinden-1-ona)	BRAF (0,16 nM) C-Raf (1,72 nM) (King <i>et al.</i> , 2006)
AZ628 (3-(2-cianopropan-2-il)-N-(4-metil-3-(3-metil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-6-ilamino)fenil) benzamida)	C-Raf-1 (29 nM) BRAF V600E (34 nM)BRAF (105 nM) (Montagut <i>et al.</i> , 2008)
AB-024/RXDX-105/CEP-32469 Urea, N-[3-[[6,7-dimetoxi-4-quinazolinil]oxy]fenil]-N'-[5-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetiletil)-3-isoxazolil]-, clorhidrato (1:1)	BRAF, EGFR, RETi
TAK-580 ((R)-2-(1-(6-amino-5-cloropirimidin-4-carboxamido)etil)-N-(5-cloro-4-(trifluorometil)piridin-2-il)tiazol-5-carboxamida)	Pan-RAF
BAL-3833/CTC3833	Pan-RAF
BGB-283 (5-[[[(1R,1aS,6bR)-1-[6-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-2-il]-1a,6b-dihidro-1H-cyclopropa[b][1]benzofuran-5-il]oxi]-3,4-dihidro-1H-1,8-naftiridin-2-ona)	B/C-RAF y EGFR

(continuación)

Fármaco	Diana(s) principal (es) (CI50)
GW5074 (2H-Indol-2-ona, 3-[(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)metilen]-1,3-dihidro-5-yodo-)	C-RAF (9 nM)
Trametinib (N-(3-(3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6,8-dimetil-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidin-1(2H)-il)fenil)acetamida)	MEK1/2 (0,92 nM/1,8 nM) (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2011)
Cobimetinib [3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]fenil][3-hidroxi-3-(2S)-2-piperidinil-1-azetidini]-metanona	MEK1 (4,2 nM) (Hoefflich <i>et al.</i> , 2012)
Selumetinib (AZD6244) (6-(4-bromo-2-clorofenilamino)-7-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-3-metil-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida)	MEK1 (14 nM) (Huynh <i>et al.</i> , 2007)
Binimetinib (1H-Benzimidazol-6-carboxamida, 5-[(4-bromo-2-fluorofenil)amino]-4-fluoro-N-(2-hidroxietoxi)-1-metil-)	MEK1/2 (12 nM) (Pheneger <i>et al.</i> , 2006)
Refametinib ((S)-N-(3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-6-metoxifenil)-1-(2,3-dihidropropil)ciclopropanil-sulfonamida)	MEK1 (19 nM) MEK2 (47 nM) (Iverson <i>et al.</i> , 2009)
Pimasertib ((S)-N-(2,3-dihidropropil)-3-(2-fluoro-4-yodofenilamino)isonicotinamida)	MEK1/2 (5 nM-2 µM) (Kim <i>et al.</i> , 2010)
U0126-EtOH (2,3-bis(amino(2-aminofeniltio)metilen)succinonitrilo, etanol)	MEK2 (0,06 µM) MEK1 (0,07 µM)
PD184352 (2-(2-cloro-4-yodofenilamino)-N-(ciclopropilmetoxi)-3,4-difluorobenzamida)	MEK1 (17 nM) MEK2 (17 nM) (Sebolt-Leopold <i>et al.</i> , 1999)
BIX 02189 ((Z)-3-((3-((dimetilamino)metil)fenilamino)(fenil)metilen)-N,N-dimetil-2-oxoindolin-6-carboxamida)	MEK5 (1,5 nM) ERK5 (59 nM) (Tatake <i>et al.</i> , 2008)
VTX11E (4-[2-(2-Chloro-4-fluoroanilino)-5-metilpirimidin-4-il]-N-[(1S)-1-(3-clorofenil)-2-hidroxietil]-1H-pirrol-2-carboxamida)	ERK2 (Ki: <2 nM) JNK3 (Ki: 1,4 µM) (Aronov <i>et al.</i> , 2009)
LTT-462	ERK
Ulixertinib (BVD-523)	ERK1/2 ERK2 (<0,3 nM)
(4-(5-cloro-2-(isopropilamin)piridin-4-il)-N-((S)-1-(3-clorofenil)-2-hidroxietil)-1H-pirrol-2-carboxamida)	(Ward <i>et al.</i> , 2015)
SCH772984 ((R)-1-(2-oxo-2-(4-(4-(pirimidin-2-il)fenil)piperazin-1-il)etil)-N-(3-(piridin-4-il)-1H-indazol-5-il)pirrolidin-3-carboxamida)	ERK2 (1 nM) ERK1 (4 nM)

* Compuesto herramientas para PLX4032

En un aspecto, la divulgación proporciona un CAF-AXL que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, tal como HuMax-CAF-AXL, para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK. En una realización de la divulgación, el uno o más inhibidores comprenden un inhibidor enumerado en la Tabla 1. Preferentemente, un inhibidor para su uso de acuerdo con la invención se selecciona de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK. En una realización específica, el uno o más inhibidores consiste en un inhibidor enumerado en la Tabla 1, p. ej., un inhibidor de BRAF, MEK o ERK.

Como alternativa, en cualquier aspecto o realización del presente documento, un CAF-AXL puede usarse junto con dos o más inhibidores seleccionados de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK, tal como junto con un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK; un inhibidor de BRAF y un inhibidor de ERK; un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK; o un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK. En una realización específica de la divulgación, al menos uno de los dos o más inhibidores es un inhibidor enumerado en la Tabla 1. En otra realización específica de la divulgación, un CAF-AXL se usa junto con dos inhibidores seleccionados de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK, p. ej., donde ambos inhibidores son inhibidores enumerados en la Tabla 1.

10 En una realización, el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de BRAF.

En una realización específica, el inhibidor de BRAF se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, PLX4720, GDC-0879, RAF265, SB590885, AZ628, AB-024, TAK-580, BAL-3833, BGB-283, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través del inhibidor de BRAF. En otra realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib. El inhibidor de BRAF puede ser vemurafenib, dabrafenib, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos.

El inhibidor de BRAF puede ser vemurafenib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es vemurafenib. Vemurafenib (PLX4032) es un inhibidor de molécula pequeña, competitivo con ATP, biodisponible por vía oral, de la cinasa BRAF, que se une particularmente, p. ej., a BRAF y lo inhibe y que comprende determinadas mutaciones, tales como, aunque no de forma limitativa, sustituciones de aminoácidos en el resto V600 (p. ej., V600E), en el resto L597 (p. ej., L597R; Bahadoran *et al.*, 2013); y en el resto K601 (Dahlman *et al.*, 2012). Vemurafenib puede tener una CI_{50} de, p. ej., aproximadamente 31 nM para la inhibición de la actividad de la cinasa BRAF(V600E) en un ensayo acelular, p. ej., en un ensayo descrito en el presente documento o en Bollag *et al.*, 2010.

En otra realización preferida de la divulgación, el inhibidor de BRAF es dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es dabrafenib. Dabrafenib es un inhibidor de la cinasa BRAF, que se une particularmente a BRAF y lo inhibe y que comprende determinadas mutaciones, tales como, aunque no de forma limitativa, mutaciones en V600 como V600E. Dabrafenib puede tener una CI_{50} de, p. ej., aproximadamente 0,8 nM para la inhibición de la actividad de la cinasa BRAF(V600E) en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Laguerre *et al.*, 2009.

En otra realización preferida de la divulgación, el inhibidor de BRAF es encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es encorafenib. Encorafenib es un inhibidor de la cinasa BRAF, que se une particularmente a BRAF y lo inhibe y que comprende determinadas mutaciones, tales como, aunque no de forma limitativa, V600E. Encorafenib puede tener una CI_{50} de, p. ej., aproximadamente 4 nM para la inhibición de la actividad de la cinasa BRAF(V600E) en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Stuart *et al.*, 2012.

En otra realización preferida de la divulgación, el inhibidor de BRAF es sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es sorafenib. Sorafenib es un inhibidor de la cinasa BRAF, que se une particularmente a BRAF y lo inhibe. Sorafenib puede tener una CI_{50} de, p. ej., aproximadamente 22 nM para la inhibición de la actividad de la cinasa BRAF en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Wilhelm *et al.*, 2004.

En una realización, el BRAFi se selecciona de AB-024, TAK-580, BAL-3833 y BGB-283.

50 En una realización, el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de MEK.

En una realización, el inhibidor de MEK es trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, refametinib, pimasetib, U0126-EtOH, PD184352, BIX 02189. En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, refametinib, pimasetib, U0126-EtOH, PD184352, o un análogo o derivado de los mismos terapéuticamente eficaz. Preferentemente, el inhibidor de MEK es trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, o un análogo o derivado de los mismos terapéuticamente eficaz.

Lo más preferentemente, el inhibidor de MEK es trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización, el inhibidor de MEK es trametinib. Trametinib es un inhibidor de MEK1/2 que puede tener, por ejemplo, una CI_{50} de aproximadamente 0,92 nM y 1,8 nM para la inhibición de las actividades serina/treonina/tirosina cinasa de MEK1 y MEK2, respectivamente, en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Yamaguchi *et al.*, 2011.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es binimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, tal como, p. ej., binimetinib. Binimetinib es un inhibidor de MEK1/2 que puede tener, por ejemplo, una CI_{50} de aproximadamente 12 nM para la inhibición de las actividades serina/treonina/tirosina cinasa de

MEK1 y MEK2, en un ensayo acelular, p. ej., como se describe en el presente documento o en Pheneger *et al.*, 2006.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es cobinimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, tal como, p. ej., cobinimetinib. Cobinimetinib es un inhibidor de MEK1 que puede tener, por ejemplo, una CI_{50} de aproximadamente 4,2 nM para la inhibición de la actividad serina/treonina/tirosina cinasa de MEK1 en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Hoeflich *et al.*, 2012.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, tal como, p. ej., selumetinib. Selumetinib es un inhibidor de MEK1 que puede tener, por ejemplo, una CI_{50} de aproximadamente 14 nM para la inhibición de la actividad serina/treonina/tirosina cinasa de MEK1 en un ensayo acelular, p. ej., como se describe en el presente documento o en Huynh *et al.*, 2007.

En una realización, el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de ERK.

En una realización, el inhibidor de ERK es LTT-462, ulixertinib (BVD-523), VTX11E, SCH772984.

Ulixertinib es un inhibidor de ERK1/2 que puede tener, por ejemplo, una CI_{50} de aproximadamente <0,3 nM para la inhibición de la actividad cinasa ERK2 en un ensayo acelular, p. ej., descrito en el presente documento o en Ward *et al.*, 2015.

Como se utiliza en el presente documento, un "derivado" de un fármaco es un compuesto que deriva o es derivable, por una reacción química directa, del fármaco de referencia. Como se utiliza en el presente documento, un "análogo" o "análogo estructural" de un fármaco de referencia es un compuesto que tiene una estructura y/o un mecanismo de acción similar al del fármaco, pero que difiere en al menos un elemento estructural. Los análogos o derivados "terapéuticamente activos" o "terapéuticamente eficaces" de un fármaco de referencia tal como, p. ej., vemurafenib, dabrafenib o trametinib, tienen una eficacia terapéutica similar o superior a la del fármaco, pero pueden diferir, p. ej., en una o más de las siguientes: estabilidad, especificidad de la diana (es decir, qué tipo de cinasa inhibe), selectividad (es decir, qué isoformas o mutantes de la cinasa inhibe), actividad inhibidora, solubilidad, toxicidad, y similares. La Tabla 1 muestra inhibidores de BRAF, MEK, ERK, etc. que tienen una especificidad similar (es decir, inhibición de BRAF, MEK, ERK, etc., respectivamente), selectividad similar, u otras similitudes en su mecanismo de acción.

En una realización específica, un análogo o derivado de un inhibidor de cinasa de acuerdo con la divulgación, (p. ej., un inhibidor de serina/treonina cinasa), tiene la misma o similar especificidad cinasa, opcionalmente también selectividad, y una CI_{50} de inhibición de la actividad cinasa similar o superior a la del fármaco de referencia en un ensayo adecuado. Por ejemplo, el análogo o derivado puede tener una CI_{50} inferior a aproximadamente 1000 %, tal como inferior a aproximadamente 300 %, tal como inferior a aproximadamente 200 %, tal como inferior a aproximadamente 120 %, tal como inferior a aproximadamente 100 %, tal como inferior a aproximadamente 80 %, tal como inferior a aproximadamente 50 % y, opcionalmente, superior a aproximadamente 1 %, tal como superior a aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 % o aproximadamente 40 %, con respecto a la CI_{50} del fármaco de referencia en un ensayo adecuado. Como alternativa, un análogo o derivado puede tener una CI_{50} inferior a aproximadamente 5 μ M, tal como inferior a aproximadamente 1 μ M, tal como inferior a aproximadamente 500 nM, tal como inferior a aproximadamente 200 nM, tal como inferior a 100 nM, tal como inferior a aproximadamente 50 nM, tal como entre 0,01 nM y 1 μ M, 0,05 nM y 200 nM o de 0,1 nM a 100 nM en un ensayo adecuado.

En la técnica se conocen bien ensayos adecuados para medir la especificidad, la selectividad y la actividad de los inhibidores de la proteína cinasa (véase, p. ej., Lynette *et al.* 2009 y Uitdehaag 2012). Por ejemplo, la actividad inhibidora de BRAF de un análogo o derivado de un inhibidor de BRAF, como se describe en el presente documento, p. ej., de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib o sorafenib; la actividad inhibidora de MEK de un análogo o derivado de un inhibidor de MEK, como se describe en el presente documento, p. ej., de trametinib, conimetinib, binimetinib o selumetinib; o la actividad inhibidora de ERK de un análogo o derivado de un inhibidor de ERK, como se describe en el presente documento, p. ej., de VTX11E o LTT-462 o ulixertinib, puede evaluarse en el ensayo descrito por Tsai *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 26 de febrero de 2008;105(8): 3041-3046). Específicamente, el perfil de la(s) cinasa(s), variantes y/o isoformas de cinasas seleccionada(s) puede trazarse con respecto a su inhibición por el análogo o derivado en comparación con el fármaco original utilizando el formato de ensayo bioquímico Z'-LYTE (SelectScreen; Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resumiendo, el valor de CI_{50} de un BRAFi (tal como vemurafenib o dabrafenib) de un mutante BRAF, p. ej., BRAF(V600E), puede determinarse a través de mediciones de la actividad de la cinasa RAF, p. ej., de la siguiente manera:

Las actividades cinasa de RAF de tipo natural (o silvestre o no mutada) y de los mutantes, se determinan midiendo la fosforilación de la proteína BAD biotinilada (agonista de muerte celular asociada a Bcl2). Para cada enzima (0,01 ng), se llevaron a cabo reacciones de 20 μ l en Hepes 20 mM (pH 7,0), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, Tween-20 al 0,01 % (v/v), proteína BAD marcada con biotina 50 nM y ATP 1 mM a temperatura ambiente. Las reacciones se detienen a los 5 min con 5 μ l de una solución que contiene Hepes 20 mM (pH 7,0), NaCl 200 mM, EDTA 80 mM, seroalbúmina bovina [BSA] al 0,3 % (p/v). La solución de detención también incluye anticuerpo fosfo-BAD (Ser112), perlas donadoras

recubiertas de estreptavidina y perlasceptoras de proteína A. El anticuerpo y las perlas se preincuban en solución de detención en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La dilución final del anticuerpo es de 1/2000 y la concentración final de cada perla es de 10 µg/ml. Las placas de ensayo se incuban a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se leen en un lector PerkinElmer AlphaQuest. Las actividades mutantes son el promedio de dos lotes diferentes de proteína purificada que se sometió a ensayo por duplicado en tres experimentos diferentes. Como alternativa, en lugar de determinar un valor de Cl_{50} absoluto, el compuesto de referencia (p. ej., vemurafenib o dabrafenib) puede utilizarse como control, y puede calcularse la actividad inhibidora relativa en comparación con la del fármaco de referencia, normalmente en %.

Resumiendo, el valor de Cl_{50} (Concentración Inhibitoria media o del 50 %) de un MEK, p. ej., MEK1, puede determinarse a través de mediciones de la actividad de la cinasa MEK, p. ej., de la siguiente manera: El anticuerpo contra MEK1 se utiliza para inmunoprecipitar moléculas de MEK1. La actividad cinasa MEK se mide como la capacidad de MEK1 inmuno-aislada para activar a ERK1 recombinante en un ensayo acoplado utilizando, como criterio de valoración del ensayo, MBP (*Myelin Basic Protein*, Proteína Básica de la Mielina). La MBP fosforilada se resuelve en un gel de SDS-PAGE al 14 % y se seca al vacío antes de exponerla a una película de rayos X. Como alternativa, en lugar de determinar un valor de Cl_{50} absoluto, el compuesto de referencia (p. ej., trametinib) puede utilizarse como control, y puede calcularse la actividad inhibidora relativa en comparación con la del fármaco de referencia, normalmente en %. También pueden usarse sustratos más específicos que la MBP, p. ej., RSK, MNK o Elk1 recombinantes, purificados y péptidos elaborados de acuerdo con los lugares de fosforilación de esta proteína.

En un aspecto de la divulgación, la invención proporciona un CAF-AXL para su uso en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método la administración de un CAF-AXL junto con al menos un agente terapéutico que sea un inhibidor de serina/treonina cinasa, en donde el CAF y el inhibidor o inhibidores de serina/treonina cinasa se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el al menos un agente terapéutico consiste en o comprende un S/Th KI que es un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK o una combinación de los mismos. En una realización de la divulgación, el S/Th KI es un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib (PLX4032) o un derivado o análogo del mismo terapéuticamente eficaz, p. ej., PLX4720 o dabrafenib; o VTXKIIIE. En una realización de la divulgación, el S/Th KI es un inhibidor de MEK, tales como selumetinib (AZD6244) o trametinib.

En una realización de la divulgación, el CAF-AXL es para su uso en un método de tratamiento del melanoma junto con uno o más S/Th KI seleccionados de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK o un inhibidor de ERK o una combinación de dos o más de los mismos. En una realización de la divulgación, el uno o más S/Th KI comprende un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib (PLX4032), dabrafenib, encorafenib, sorafenib o un derivado o análogo de los mismos terapéuticamente eficaz, p. ej., PLX4720. En una realización de la divulgación, uno o más S/Th KI comprenden un inhibidor de MEK, tal como trametinib, cobimetinib, binimetinib o selumetinib (AZD6244) o un análogo o derivado de los mismos terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el uno o más S/Th KI comprende un inhibidor de ERK, tal como, p. ej., VTXKIIIE, LTT-462, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el uno o más S/Th KI consiste en un inhibidor de BRAF, tal como vemurafenib, dabrafenib, encorafenib o sorafenib. En una realización de la divulgación, el al menos un S/Th KI consiste en un inhibidor de MEK, tal como trametinib, cobimetinib, binimetinib o selumetinib. En una realización de la divulgación, el uno o más S/Th KI consiste en un inhibidor de ERK, tal como ulixertinib, VTXIIE, SCH772984 o LTT-462. A continuación se describen realizaciones específicas de la divulgación para el tratamiento del melanoma según cualquier aspecto o realización del presente documento:

En una realización particular, el S/Th KI es vemurafenib.

En una realización particular, el S/Th KI es dabrafenib.

En una realización particular, el S/Th KI es encorafenib.

En una realización particular, el S/Th KI es sorafenib.

En una realización particular, el S/Th KI es trametinib.

En una realización particular, el S/Th KI es cobimetinib.

En una realización particular, el S/Th KI es binimetinib.

En una realización particular, el S/Th KI es selumetinib.

En una realización particular, el S/Th KI es ulixertinib.

En una realización particular, el S/Th KI es VTXKIIIE.

En una realización particular, el S/Th KI es LTT-462.

En una realización particular, el S/Th KI es PLX4720.

Como se describe en los Ejemplos 19 y 20, una combinación de HuMax-CAF-AXL, de un inhibidor de BRAF y de un inhibidor de MEK, fue eficaz en el tratamiento de un modelo *in vivo* de melanoma resistente mutante de BRAF. En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona un CAF-AXL que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, tal como HuMax-CAF-AXL, para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con dos inhibidores de la vía MAPK. En una realización de la divulgación, al menos uno de los dos inhibidores (denominados en el presente documento "primer" y "segundo" inhibidor), opcionalmente ambos, se seleccionan de los inhibidores enumerados en la Tabla 1, o análogos o derivados de los mismos terapéuticamente eficaces. Por ejemplo, en distintas realizaciones de la divulgación, el primer inhibidor se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, cometinib, binimetinib, selumetinib, LTT-462, ulixertinib, SCH772984 y VTXKIIE, y el segundo inhibidor se selecciona independientemente de los otros inhibidores distintos del primer inhibidor de la Tabla 1. Más preferentemente, tanto el primer inhibidor como el segundo inhibidor se seleccionan de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, cometinib, binimetinib, selumetinib, LTT-462, ulixertinib, SCH772984 y VTXKIIE. Preferentemente, tanto el primer como el segundo inhibidor, para su uso de acuerdo con la invención, se seleccionan independientemente de un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK un inhibidor de ERK. Más preferentemente, la combinación del primer y segundo inhibidor se selecciona de un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, un inhibidor de BRAF y un inhibidor de ERK, un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK. Lo más preferentemente, el CAF-AXL es para su uso en el tratamiento del melanoma junto con un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de BRAF y el segundo inhibidor es un inhibidor de MEK seleccionado de trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de BRAF y el segundo inhibidor es un inhibidor de ERK seleccionado de VTXKIIE y LTT-462, o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de MEK y el segundo inhibidor es un inhibidor de BRAF seleccionado de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib y sorafenib, o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de MEK y el segundo inhibidor es un inhibidor de ERK seleccionado de VTXKIIE y LTT-462, o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de ERK y el segundo inhibidor es un inhibidor de BRAF seleccionado de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib sorafenib, o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización de la divulgación, el primer inhibidor es un inhibidor de ERK y el segundo inhibidor es un inhibidor de MEK seleccionado de trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib o un análogo o derivado de cualquiera de los mismos.

En una realización, el CAF-AXL es para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con una combinación de un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK seleccionados de (a) a (p):

- (a) vemurafenib y trametinib;
- (b) vemurafenib y cobimetinib;
- (c) vemurafenib y binimetinib;
- (d) vemurafenib y selumetinib;
- (e) dabrafenib y trametinib;
- (f) dabrafenib y cobimetinib;
- (g) dabrafenib y binimetinib;
- (h) dabrafenib y selumetinib;
- (i) encorafenib y trametinib;
- (j) encorafenib y cobimetinib;
- (k) encorafenib y binimetinib;
- (l) encorafenib y selumetinib;
- (m) sorafenib y trametinib;
- (n) sorafenib y cobimetinib;
- (o) sorafenib y binimetinib; o
- (p) sorafenib y selumetinib.

En una realización específica de la divulgación, el inhibidor de BRAF de uno cualquiera de (a) a (p), es un análogo o derivado terapéuticamente eficaz del inhibidor de BRAF especificado.

En una realización específica de la divulgación, el inhibidor de MEK en una cualquiera de (a) a (p) es un análogo o

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" es normalmente un ser humano al que se administra el CAF-AXL y uno o más inhibidores de la vía MAPK, normalmente un paciente humano al que se le ha diagnosticado que tiene un melanoma o que corre el riesgo de desarrollarlo. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto no se ha sometido anteriormente a un tratamiento del melanoma con un inhibidor de la vía MAPK, tal como con un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK o un inhibidor de ERK. En otras realizaciones de la divulgación, el sujeto ya se está sometiendo o se ha sometido anteriormente a un tratamiento del melanoma con uno o más inhibidores de la vía MAPK, tal como uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., inhibidores de serina/treonina cinasa, para su uso junto con un CAF-AXL de acuerdo con la invención.

Como se muestra en el presente documento, el desarrollo de resistencia en el melanoma se ha asociado a una expresión aumentada o *de novo* de AXL (véanse, p. ej., los Ejemplos 17 y 21). Por ejemplo, la resistencia a uno o más de vemurafenib, dabrafenib y trametinib pueden estar asociada a la expresión *de novo* o aumentada de AXL en las células tumorales. Por tanto, los melanomas son idóneos para el tratamiento con combinaciones de estos y otros inhibidores de la vía MAPK y un CAF específico de AXL. El melanoma puede ser un melanoma en estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV, de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos del melanoma, que se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, el melanoma que se va a tratar de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento, es un melanoma en estadio IV.

En algunas realizaciones, el melanoma lleva una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través de uno o más inhibidores de BRAF. Las mutaciones de BRAF identificadas en cánceres humanos como el melanoma suelen localizarse en el bucle P rico en glicina del lóbulo N y en el segmento de activación y regiones flanqueantes dentro del dominio cinasa, lo que normalmente provoca una sobreactivación de la vía de señalización MAPK posterior (*downstream*) en las células tumorales que expresan cinasa BRAF mutante. En BRAF, los restos específicos para dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, V600 (p. ej., V600E, V600K, V600D, V600R), resto L597 (p. ej., L597R); y resto K601 (K601E). En una realización, la mutación está en V600. En una realización, la mutación en BRAF se selecciona entre V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. En una realización específica, la mutación es V600E. En la técnica se conocen bien métodos para identificar dichas mutaciones BRAF, véanse, p. ej., los Ejemplos y Colombino *et al.* (2012). Los melanomas que llevan dichas mutaciones en BRAF son particularmente adecuados para cualquier aspecto o realización de la invención que incluya un BRAFi, en particular un mutBRAFi tal como vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, y análogos o derivados de cualquiera de los mismos.

En algunas realizaciones, el melanoma lleva una mutación en NRAS (UniProtKB - P01111 (RAS_HUMAN)). Dichas mutaciones se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., Colombino *et al.*, 2012). Por ejemplo, la mutación puede ser una mutación que active constitutivamente la vía MAPK (en lo sucesivo denominada en el presente documento mutación "activadora"), que puede ser una mutación oncogénica. Las mutaciones no limitativas incluyen sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos; preferentemente, la mutación es una sustitución de aminoácidos. Los restos específicos de dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, Q61 (p. ej., Q61R, Q61K y Q61L), G12 (p. ej., G12D, G12S, G12C y G12V) y G13 (G13D y G13R). En una realización de la divulgación, el melanoma lleva al menos una mutación seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. En la técnica se conocen bien métodos para identificar dichas mutaciones NRAS, véanse, p. ej., los Ejemplos y Colombino *et al.* (2012). Los melanomas que llevan dichas mutaciones en NRAS son particularmente adecuados para cualquier aspecto o realización de la invención que incluya un MEKi, en particular un MEKi tal como trametinib, binimetinib, cobimetinib o selumetinib y análogos o derivados de cualquiera de los mismos. Opcionalmente, el aspecto o divulgación no incluye la administración de un mutBRAFi.

En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma que se va a tratar de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento, es resistente a uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., a al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa. El melanoma puede, por ejemplo, ser resistente a uno o más de los inhibidores de BRAF vemurafenib, dabrafenib, encorafenib y sorafenib, a uno o más de los MEKi, trametinib, cobimetinib, binimetinib y selumetinib, y/o a uno o más de los inhibidores de ERK ulixertinib, LTT-462, VTX11E y SCH772984.

Como se utiliza en el presente documento, un melanoma "resistente", "resistente al tratamiento" o "insensible" en un sujeto con respecto a uno o más agentes terapéuticos, significa que el melanoma no responde al tratamiento con el (los) agente(s) terapéutico(s). El melanoma puede, por ejemplo, tener "resistencia natural", es decir, no responder a un tratamiento con el agente terapéutico desde el inicio del tratamiento (en el presente documento también se denomina "resistencia intrínseca"). Como alternativa, el melanoma puede haber "adquirido resistencia", ya que respondió inicialmente al tratamiento con el agente terapéutico, p. ej., por remisión o estabilización de la enfermedad, pero deja de responder o responde menos al agente terapéutico después de un determinado periodo de tratamiento o después de una recidiva del melanoma, lo que habitualmente provoca una enfermedad progresiva. Otros indicadores de resistencia incluyen recidiva o recurrencia del melanoma, aumento de la carga tumoral, metástasis recientemente identificadas o similares, a pesar del tratamiento con el agente terapéutico. Un experto puede determinar si un melanoma es resistente a un agente terapéutico o si corre el riesgo de serlo. Por ejemplo, la National Comprehensive Cancer Network (NCCN, www.nccn.org) y la European Society for Medical Oncology (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) ofrecen directrices para evaluar si un cáncer específico responde al tratamiento.

Por tanto, en algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma no se ha tratado anteriormente con ningún inhibidor

de la vía MAPK. En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma no se ha tratado anteriormente con ninguno del uno o más inhibidores de la vía MAPK de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento. Por ejemplo, en realizaciones particulares de la divulgación, el melanoma no se ha tratado anteriormente con ninguno de uno o más de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, binimetinib, cobimetinib y selumetinib.

En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma es resistente al menos a un inhibidor de la vía MAPK. En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma es resistente al menos a uno del uno o más inhibidores de la vía MAPK de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento. Por ejemplo, en realizaciones particulares de la divulgación, el melanoma es resistente a uno cualquiera o más de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, binimetinib, cobimetinib y selumetinib.

En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma tiene resistencia natural (intrínseca) a al menos un inhibidor de la vía MAPK. En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma tiene resistencia natural (intrínseca) a al menos uno del uno o más inhibidores de la vía MAPK de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento. Por ejemplo, en realizaciones particulares de la divulgación, el melanoma tiene resistencia natural (intrínseca) a uno cualquiera o más de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, binimetinib, cobimetinib y selumetinib.

En algunas realizaciones de la divulgación, el melanoma ha adquirido resistencia a al menos uno del uno o más inhibidores. El melanoma puede, por ejemplo, estar recibiendo o haber recibido anteriormente tratamiento con al menos uno del uno o más inhibidores de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento. Opcionalmente, el melanoma puede ser un melanoma recurrente o recidivante.

En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente o sensible al menos a uno de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib y sorafenib. Por ejemplo, el sujeto puede haber recibido tratamiento con vemurafenib, dabrafenib, encorafenib o sorafenib durante un periodo de al menos 2 meses, tal como de al menos 3 meses, tal como de al menos 7 meses, tal como de al menos 9 meses, tal como de al menos 12 meses o más.

En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente o sensible al menos a uno de trametinib, cobimetinib, binimetinib y selumetinib. Por ejemplo, el sujeto puede haber recibido tratamiento con trametinib, cobimetinib, binimetinib o selumetinib durante un periodo de al menos 2 meses, tal como de al menos 3 meses, tal como de al menos 7 meses, tal como de al menos 9 meses, tal como de al menos 12 meses o más.

En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente o sensible al menos a uno de dabrafenib o trametinib, opcionalmente a ambos. Por ejemplo, el sujeto puede haber recibido tratamiento con una combinación de trametinib y dabrafenib durante un periodo de al menos 2 meses, tal como de al menos 3 meses, tal como de al menos 7 meses, tal como de al menos 9 meses, tal como de al menos 12 meses o más.

En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente o sensible al menos a uno de vemurafenib o trametinib, opcionalmente a ambos. Por ejemplo, el sujeto puede haber recibido tratamiento con una combinación de vemurafenib y dabrafenib durante un periodo de al menos 2 meses, tal como de al menos 3 meses, tal como de al menos 7 meses, tal como de al menos 9 meses, tal como de al menos 12 meses o más.

En otras realizaciones de la divulgación, el melanoma que se va a tratar de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento, no es resistente a ninguno del uno o más inhibidores. El melanoma puede, por ejemplo, no haber recibido ningún tratamiento con alguno del uno o más inhibidores de acuerdo con cualquier aspecto o realización del presente documento. Sin embargo, también es posible que el melanoma esté en tratamiento con uno o más de dichos inhibidores, o que se haya tratado con cualquiera del uno o más inhibidores, pero no se haya producido resistencia. En dichas realizaciones, el sujeto puede, por ejemplo, haber recibido tratamiento con vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, trametinib, binimetinib, cobimetinib o selumetinib durante un periodo de al menos 2 meses, tal como de al menos 3 meses, tal como de al menos 7 meses, tal como de al menos 9 meses, tal como de al menos 12 meses o más.

En una realización particular de la divulgación, el CAF-AXL proporcionado en la presente divulgación, es para su uso en el tratamiento de un melanoma que expresa AXL resistente a un agente terapéutico con el que el melanoma se está tratando o se ha tratado, en donde el agente terapéutico es vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos, y en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF. En particular, el melanoma presenta una mutación en BRAF que lo hace sensible a la inhibición por vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib o por el análogo o derivado terapéuticamente eficaz. Preferentemente, la mutación es una sustitución de aminoácidos. Los restos específicos de dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, V600 (p. ej., V600E, V600K y V600D), el resto L597 (p. ej., L597R); y resto K601 (K601E). En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E.

En una realización particular de la divulgación, el CAF-AXL proporcionado en la presente divulgación, es para su uso en el tratamiento de un melanoma que expresa AXL resistente a un agente terapéutico con el que el melanoma se está tratando o se ha tratado, en donde el agente terapéutico es trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib o un

análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos. El melanoma puede llevar una mutación, tal como una mutación activadora, en NRAS. Por ejemplo, el NRAS puede tener una mutación en, Q61 (p. ej., Q61R, Q61K y Q61L), G12 (p. ej., G12D, G12S, G12C y G12V) o G13 (G13D y G13R). En una realización, el melanoma lleva al menos una mutación seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R.

En una realización particular de la divulgación, el CAF-AXL proporcionado en la presente divulgación, es para su uso en el tratamiento de un melanoma que expresa AXL resistente a un agente terapéutico con el que el melanoma se está tratando o se ha tratado, en donde el agente terapéutico es LTT-462, ulixertinib, VTXKIIIE, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos.

En cuanto al CAF-AXL, un médico experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz necesaria de la composición farmacéutica. En relación con esto, cuando se hace referencia a una composición farmacéutica debe entenderse que comprende también una composición como tal, o viceversa. Por ejemplo, el médico podría comenzar las dosis del CAF-AXL empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico de acuerdo con una pauta posológica particular. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente.

Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para el uso terapéutico puede medirse por su capacidad para estabilizar el avance de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse, por ejemplo, en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o inducir citotoxicidad mediante ensayos *in vitro* conocidos por el profesional experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas de un sujeto. Un experto habitual en la materia sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como la estatura del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada. Por ejemplo, como ya se ha indicado, pueden usarse las directrices de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN, www.nccn.org) y la European Society for Medical Oncology (ESMO, www.esmo.org/Guidelines) para evaluar los tratamientos contra el cáncer.

Un intervalo ilustrativo, no limitativo, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un CAF-AXL de la invención, es de 0,02-100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,05-10 mg/kg, 0,1-5 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,5-3 mg/kg o de 0,5-2 mg/kg.

La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y por ejemplo, administrarse proximal al lugar de la diana.

Las pautas posológicas en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una única embolada, varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

En una realización de la divulgación, la ventana de eficacia-seguridad se optimiza disminuyendo la toxicidad específica, tal como, por ejemplo, disminuyendo la relación fármaco-anticuerpo (RFA) y/o mezclando el CAF-AXL con anticuerpo contra AXL no marcado.

En una realización de la divulgación, la eficacia del tratamiento se controla durante la terapia, p. ej., en puntos predefinidos en el tiempo. Los métodos para medir la eficacia suelen depender del tipo concreto de cáncer y el experto en la materia los conoce perfectamente. En una realización, la eficacia puede controlarse observando la zona de la enfermedad, o mediante otros métodos de diagnóstico descritos más adelante en el presente documento, p. ej., realizando una o más tomografías PET (emisión positrónica) - CT (computarizada), por ejemplo, usando un anticuerpo, un fragmento o un minianticuerpo derivado de un anticuerpo específico de AXL, contra AXL marcado.

Si se desea, una dosis diaria eficaz de un CAF-AXL puede ser de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, formas farmacéuticas unitarias. En otra realización, los CAF-AXL se administran mediante infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como superior a 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario no deseado.

También puede administrarse una dosis eficaz de un CAF-AXL utilizando un periodo de dosificación semanal, quincenal o trisemanal. El periodo de dosificación puede limitarse a, p. ej., 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido una evolución clínica. En una realización de la divulgación, un CAF-AXL se administra una vez cada 3 semanas (1C3S) o tres administraciones durante 4 semanas (3C4S), de modo que el paciente recibe dieciséis o doce ciclos de CAF-AXL a intervalos de tres o cuatro semanas durante, p. ej., 48 semanas, ampliando o repitiendo la pauta según sea necesario.

Por ejemplo, en una realización de la divulgación, el CAF-AXL puede administrarse por infusión a una dosis semanal de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 200 y 400 mg/m². Esta administración podrá repetirse, p. ej., de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

En otra realización de la divulgación, el CAF-AXL se administra por infusión cada tres semanas en una dosis de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 50-200 mg/m². Esta administración podrá repetirse, p. ej., de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

En una realización de la divulgación, un CAF-AXL se administra en una dosis única de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg, tal como de aproximadamente 1-3 mg/kg, cada semana o cada tres semanas hasta doce veces, hasta ocho veces, o hasta la evolución clínica. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

En una realización de la divulgación, el CAF-AXL se administra en una cantidad de aproximadamente 0,02-100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,05-10 mg/kg cada 1 semana (1C1S), cada 2 semanas (1C2S) o cada 3 semanas (1C3S) o tres administraciones durante 4 semanas (3C4S). Normalmente, el paciente puede recibir dieciséis o doce ciclos de CAF-AXL a intervalos de tres o cuatro semanas durante, p. ej., 48 semanas, alargando, acortando o repitiendo la pauta terapéutica según determine el médico responsable. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 1 a 24 horas, tal como de 1 a 12 horas.

Dichas pautas terapéuticas podrán repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosis puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre después de su administración, por ejemplo, extrayendo una muestra biológica y usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirijan a la región de unión al antígeno de los anticuerpos contra AXL.

En una realización de la divulgación, los CAF-AXL se administran como terapia de mantenimiento, tal como, p. ej., una vez por semana durante un período de seis meses o mayor. Como se utiliza en el presente documento, "terapia de mantenimiento" significa terapia destinada a evitar o retrasar la evolución o reaparición del cáncer. Normalmente, si un cáncer está en remisión completa tras el tratamiento inicial, la terapia de mantenimiento puede utilizarse para evitar o retrasar la reaparición del cáncer. Si el cáncer ha evolucionado y no se ha logrado la remisión completa tras el tratamiento inicial, la terapia de mantenimiento puede utilizarse para ralentizar el crecimiento del cáncer, p. ej., alargar la vida del paciente.

En otros ejemplos no limitativos, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una dosis diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1-50 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al día, al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o como alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 tras el inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis únicas o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de los mismos.

Las composiciones parenterales pueden formularse en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria, como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los pacientes que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el transportador farmacéutico necesario. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la presente invención está establecida por, y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de preparación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Como se describe en el presente documento, un CAF-AXL se usa junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., uno o más inhibidores de serina/treonina cinasa, opcionalmente, al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa al que el melanoma sea resistente.

El CAF-AXL, y uno o más inhibidores de la vía MAPK, tal como uno o más inhibidores de serina/treonina cinasa, pueden administrarse de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. Por ejemplo, en una realización, la combinación se usa para tratar a un paciente con melanoma que no ha recibido tratamiento previo con el inhibidor, opcionalmente, no con ningún inhibidor de serina/treonina cinasa. En otra realización, la combinación se usa para tratar a un paciente con melanoma en el que ha fracasado un tratamiento previo con el inhibidor, p. ej., el inhibidor de serina/treonina cinasa. Las dosis y pautas posológicas eficaces del CAF-AXL y del inhibidor o inhibidores dependen del melanoma y del paciente que se vaya a tratar, y los expertos en la materia pueden determinarlas.

En una realización de la divulgación, las dosis y pautas posológicas de uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., del uno o más inhibidores de serina/treonina cinasa que se usarán junto con el CAF-AXL, son iguales o prácticamente similares a las que se usan normalmente en el tratamiento de un cáncer, p. ej., melanoma con el uno o más inhibidores de serina/treonina cinasa.

5 Vemurafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas).

10 Dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

15 Encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como 300 mg una vez al día (CD).

20 Sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg).

25 Trametinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,1-10 mg, tal como de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el trametinib se administra en forma de 2 mg por vía oral una vez al día, p. ej., a una hora similar todos los días sin comida, al menos 1 hora antes o 2 horas después de una comida.

30 Cobimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10 a 100 mg, tal como de aproximadamente 30 a 80 mg, tal como de aproximadamente 60 mg al día, opcionalmente dividida en 2, 3 o 4 dosis distintas. Preferentemente, el cobimetinib se administra a una dosis de 60 mg al día (3 comprimidos de 20 mg) en ciclos de 28 días, en donde el fármaco se toma durante 21 días consecutivos, seguido de un descanso de 7 días.

35 Binimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10-200 mg, tal como de 150 mg, tal como de 100 mg, tal como de 90 mg, tal como de 45 mg, tal como de 30 mg, tal como de 20 mg una o dos veces al día, o cada 2, 3 o 4 días, tal como de 45 mg dos veces al día.

40 Selumetinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-225 mg, tal como de 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg o 225 mg una o dos veces al día, tal como dos veces al día, opcionalmente en un pauta terapéutica en la que se administra durante tres días seguido de cuatro días de descanso en ciclos de cuatro semanas.

45 En una realización de la divulgación, las dosis del inhibidor o inhibidores de la vía MAPK, p. ej., del inhibidor o inhibidores de serina/treonina cinasa, son inferiores a las utilizadas normalmente, pero la pauta posológica es, por lo demás, similar. En una realización de la divulgación, las dosis del inhibidor o inhibidores de la vía MAPK, tal como del inhibidor o inhibidores de serina/treonina cinasa, son similares a las utilizados normalmente, pero la pauta posológica se ajusta a menos administraciones o éstas son menos frecuentes. En una realización de la divulgación, las dosis del inhibidor o inhibidores de serina/treonina cinasa son inferiores a las utilizadas normalmente y la pauta posológica se ajusta a menos administraciones o éstas son menos frecuentes.

50 En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, opcionalmente HuMax-CAF-AXL, y (ii) uno o más inhibidores de la vía MAPK, tal como uno o más inhibidores de serina/treonina cinasa, en donde el CAF y el al menos un inhibidor se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK o una combinación de cualquiera de dos o más de los mismos, tal como un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, un inhibidor de BRAF y un inhibidor de ERK, o un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente al menos a uno de los uno o más inhibidores. En una realización de la divulgación, el inhibidor es un inhibidor de BRAF seleccionado de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib o un análogo o derivado del mismos terapéuticamente eficaz, y el melanoma presenta una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través del inhibidor de BRAF. En una realización de la divulgación, el inhibidor es un inhibidor de MEK seleccionado de trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. El CAF-AXL puede administrarse, p. ej., en una cantidad terapéuticamente eficaz de acuerdo con una pauta posológica descrita anteriormente con más detalle. Por ejemplo, como ejemplo no limitativo, el CAF-AXL puede administrarse en

una cantidad de aproximadamente 0,02-100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,05-10 mg/kg cada 1 semana (1C1S), cada 2 semanas (1C2S) o cada 3 semanas (1C3S) o tres administraciones durante 4 semanas (3C4S), de modo que el paciente reciba dieciséis o doce ciclos de CAF-AXL a intervalos de tres semanas o cuatro semanas durante, p. ej., 48 semanas, alargando, acortando o repitiendo la pauta terapéutica según determine el médico responsable.

En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) un inhibidor de BRAF seleccionado de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib y sorafenib o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz de cualquiera de los mismos; y (iii) un inhibidor de MEK seleccionado de trametinib, cobimetinib, binimetinib y selumetinib, o un análogo o derivado terapéuticamente eficaz o cualquiera de los mismos; en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través del inhibidor de BRAF, y en donde el CAF, el inhibidor de BRAF y el inhibidor de MEK se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial en cantidades terapéuticamente eficaces. En una realización, la mutación se encuentra en un resto de BRAF seleccionado de V600, L597 y K601, tal como una mutación seleccionada de V600E, V600K, V600D, L597R y K601E, tal como V600E. En una realización particular de la divulgación, el melanoma no lleva una mutación activadora en NRAS.

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con vemurafenib de la actividad de la cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a vemurafenib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con vemurafenib, o puede estar en tratamiento con vemurafenib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, p. ej., dabrafenib, encorafenib o sorafenib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de BRAF, p. ej., dabrafenib, encorafenib o sorafenib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a vemurafenib y/o no se ha tratado anteriormente con vemurafenib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Por ejemplo, vemurafenib puede administrarse por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, el método comprende administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a dabrafenib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con dabrafenib, o puede estar en tratamiento con dabrafenib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, encorafenib o sorafenib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, encorafenib o sorafenib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a dabrafenib y/o no se ha tratado anteriormente con dabrafenib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con encorafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, el método comprende administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a AXL humana y (ii) encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a encorafenib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con encorafenib, o puede estar en tratamiento con encorafenib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, dabrafenib o sorafenib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, dabrafenib o sorafenib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a encorafenib y/o no

se ha tratado anteriormente con encorafenib. En una realización, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El encorafenib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como de 300 mg una vez al día.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización, el melanoma es resistente a sorafenib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con sorafenib, o puede estar en tratamiento con sorafenib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, dabrafenib o encorafenib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de BRAF, p. ej., vemurafenib, dabrafenib o encorafenib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a sorafenib y/o no se ha tratado anteriormente con sorafenib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El sorafenib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg).

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) trametinib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización, el melanoma es resistente a trametinib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con trametinib, o puede estar en tratamiento con trametinib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de MEK, p. ej., binimetinib, cobimetinib o selumetinib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de MEK, p. ej., binimetinib, cobimetinib o selumetinib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a trametinib y/o no se ha tratado anteriormente con trametinib. En una realización, el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. El trametinib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) cobimetinib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a cobimetinib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con cobimetinib, o puede estar en tratamiento con cobimetinib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, binimetinib o selumetinib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, binimetinib o selumetinib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a cobimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con cobimetinib. En una realización, el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. El cobimetinib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Cobimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10 a 100 mg, tal como de aproximadamente 30 a 80 mg, tal como de aproximadamente 60 mg al día, opcionalmente dividida en 2, 3 o 4 dosis distintas. Preferentemente, el cobimetinib se administra a una dosis de 60 mg al día (3 comprimidos de 20 mg) en ciclos de 28 días, en donde el fármaco se toma durante 21 días consecutivos, seguido de un descanso de 7 días.

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) binimetinib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización, el melanoma es

resistente a binimetinib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con binimetinib, o puede estar en tratamiento con binimetinib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, cobimetinib o selumetinib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, cobimetinib o selumetinib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a binimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con binimetinib. En una realización de la divulgación, el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. El binimetinib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Binimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10-200 mg, tal como de 150 mg, tal como de 100 mg, tal como de 90 mg, tal como de 45 mg, tal como de 30 mg, tal como de 20 mg una o dos veces al día, o cada 2, 3 o 4 días, tal como de 45 mg dos veces al día.

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y (ii) selumetinib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, en donde (i) y (ii) se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a selumetinib. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con selumetinib, o puede estar en tratamiento con selumetinib. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, cobimetinib o binimetinib; o puede estar en tratamiento con otro inhibidor de MEK, p. ej., trametinib, cobimetinib o binimetinib. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a selumetinib y/o no se ha tratado anteriormente con selumetinib. En una realización de la divulgación, el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. El selumetinib se administra normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz y de acuerdo con una pauta posológica adecuada. Selumetinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-225 mg, tal como de 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg o 225 mg una o dos veces al día, tal como dos veces al día, opcionalmente en una pauta terapéutica en la que se administra durante tres días seguido de cuatro días de descanso en ciclos de cuatro semanas.

En una realización del CAF-AXL para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, el melanoma presenta una mutación en NRAS, p. ej., una mutación activadora en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a dabrafenib, trametinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con dabrafenib, trametinib o ambos, o puede estar en tratamiento con dabrafenib, trametinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK, o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a dabrafenib ni a trametinib y/o no se ha tratado anteriormente con dabrafenib o trametinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer. El trametinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 1 a 4 mg, tal como de aproximadamente 2-3 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

En una realización, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un melanoma resistente a dabrafenib, trametinib o ambos en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el cáncer es un cáncer que expresa AXL. En una realización, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en

forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer. El trametinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 1 a 4 mg, tal como de aproximadamente 2-3 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

5

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con vemurafenib de la actividad de la cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a vemurafenib, trametinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con vemurafenib, trametinib o ambos, o puede estar en tratamiento con vemurafenib, trametinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK, o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a vemurafenib ni a trametinib y/o no se ha tratado anteriormente con vemurafenib o trametinib. En una realización, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas). El trametinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 1 a 4 mg, tal como de aproximadamente 2-3 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

20

25

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con encorafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a encorafenib, trametinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con encorafenib, trametinib o ambos, o puede estar en tratamiento con encorafenib, trametinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK, o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a encorafenib ni a trametinib y/o no se ha tratado anteriormente con encorafenib o trametinib. En una realización, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día (CD). El trametinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 1 a 4 mg, tal como de aproximadamente 2-3 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

30

35

40

45

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) trametinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización, el melanoma es resistente a sorafenib, trametinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con sorafenib, trametinib o ambos, o puede estar en tratamiento con sorafenib, trametinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK, o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a sorafenib ni a trametinib y/o no se ha tratado anteriormente con sorafenib o trametinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg). El trametinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg, tal como de aproximadamente 1 a 4 mg, tal como de aproximadamente 2-3 mg, tal como de aproximadamente 2 mg, una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día.

50

55

60

65

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo

terapéuticamente eficaz y (iii) cobimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a dabrafenib, cobimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con dabrafenib, cobimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con dabrafenib, cobimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a dabrafenib ni a cobimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con dabrafenib o cobimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con vemurafenib de la actividad de la cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) cobimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a vemurafenib, cobimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con vemurafenib, cobimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con vemurafenib, cobimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a vemurafenib ni a cobimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con vemurafenib o cobimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas).

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con encorafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) cobimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a encorafenib, cobimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con encorafenib, cobimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con encorafenib, cobimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a encorafenib ni a cobimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con encorafenib o cobimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día (CD).

En una realización de la divulgación, la invención se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) cobimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a sorafenib, cobimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con sorafenib, cobimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con sorafenib, cobimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a sorafenib ni a cobimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con sorafenib o cobimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg).

El cobimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10 a 100 mg,

tal como de aproximadamente 30 a 80 mg, tal como de aproximadamente 60 mg al día, opcionalmente dividida en 2, 3 o 4 dosis distintas. Preferentemente, el cobimetinib se administra a una dosis de 60 mg al día (3 comprimidos de 20 mg) en ciclos de 28 días, en donde el fármaco se toma durante 21 días consecutivos, seguido de un descanso de 7 días.

5

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) binimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a dabrafenib, binimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con dabrafenib, binimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con dabrafenib, binimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a dabrafenib ni a binimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con dabrafenib o binimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con vemurafenib de la actividad de la cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) binimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a vemurafenib, binimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con vemurafenib, binimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con vemurafenib, binimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a vemurafenib ni a binimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con vemurafenib o binimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con encorafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) binimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a encorafenib, binimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con encorafenib, binimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con encorafenib, binimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a encorafenib ni a binimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con encorafenib o binimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día (CD).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) binimetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a sorafenib, binimetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con sorafenib, binimetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con sorafenib, binimetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un

melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a sorafenib ni a binimetinib y/o no se ha tratado anteriormente con sorafenib o binimetinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg).

El binimetinib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 10-200 mg, tal como de 150 mg, tal como de 100 mg, tal como de 90 mg, tal como de 45 mg, tal como de 30 mg, tal como de 20 mg una o dos veces al día, o cada 2, 3 o 4 días, tal como de 45 mg dos veces al día.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con dabrafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) dabrafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a dabrafenib, selumetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con dabrafenib, selumetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con dabrafenib, selumetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a dabrafenib ni a selumetinib y/o no se ha tratado anteriormente con dabrafenib o selumetinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El dabrafenib puede administrarse al sujeto, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-300 mg, tal como de aproximadamente 100-200 mg, tal como de aproximadamente 150 mg, una o dos veces al día o cada 2 o 3 días. Preferentemente, el dabrafenib se administra en forma de 150 mg por vía oral dos veces al día, p. ej., al menos 1 hora antes de comer o al menos 2 horas después de comer.

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con vemurafenib de la actividad de la cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) vemurafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a vemurafenib, selumetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con vemurafenib, selumetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con vemurafenib, selumetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización, el melanoma no es resistente a vemurafenib ni a selumetinib y/o no se ha tratado anteriormente con vemurafenib o selumetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El vemurafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 200-2000 mg, 500-1500 mg, tal como de aproximadamente 1000 mg al día, p. ej., 960 mg, administrados en 4 comprimidos de 240 mg cada 12 horas (con un intervalo aproximado de 12 horas).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF y la mutación permite la inhibición con encorafenib de la actividad cinasa BRAF del BRAF mutante, comprendiendo el método administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) encorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a encorafenib, selumetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con encorafenib, selumetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con encorafenib, selumetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a encorafenib ni a selumetinib y/o no se ha tratado anteriormente con encorafenib o selumetinib. En una realización de la divulgación, la mutación en BRAF es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El encorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 600 mg, tal como de 400 mg, tal como de 300 mg, tal como de 200 mg, tal como de 100 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como una vez al día (CD).

En una realización, la divulgación se refiere al uso de un CAF-AXL en un método de tratamiento de un melanoma en un sujeto, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF, comprendiendo el método

administrar al sujeto (i) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, (ii) sorafenib, o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz y (iii) selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz. En una realización de la divulgación, el melanoma es resistente a sorafenib, selumetinib o ambos. Por ejemplo, el melanoma puede haberse tratado anteriormente con sorafenib, selumetinib o ambos, o puede estar en tratamiento con sorafenib, selumetinib o ambos. Como alternativa, el melanoma puede haberse tratado anteriormente, o puede estar en tratamiento, con otro inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o ambos. El melanoma puede ser, por ejemplo, un melanoma recidivante. En una realización de la divulgación, el melanoma es un melanoma que expresa AXL. En otra realización de la divulgación, el melanoma no es resistente a sorafenib ni a selumetinib y/o no se ha tratado anteriormente con sorafenib o selumetinib. En una realización de la divulgación, la mutación es una sustitución de aminoácidos en el resto V600, L597 y/o K601. En una realización de la divulgación, la mutación se selecciona de V600E, V600D, V600K, L597R y K601E. El sorafenib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis total de 200-1600 mg, tal como de 1200 mg, tal como de 800 mg, tal como de 600 mg, tal como de 400 mg una o dos veces al día o cada 2, 3 o 4 días, tal como dos comprimidos de 200 mg dos veces al día (equivalente a una dosis diaria total de 800 mg).

Selumetinib puede administrarse, por ejemplo, por vía oral a una dosis de aproximadamente 50-225 mg, tal como de 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg o 225 mg una o dos veces al día, tal como dos veces al día, opcionalmente en un pauta terapéutica en la que se administra durante tres días seguido de cuatro días de descanso en ciclos de cuatro semanas.

En una realización de la divulgación del CAF-AXL para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, el melanoma no presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q.61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R. En dichas realizaciones, uno o más inhibidores de la vía MAPK, p. ej., el inhibidor de serina/treonina cinasa, puede comprender o consistir en un BRAFi, p. ej., vemurafenib, dabrafenib, encorafenib o sorafenib.

En una realización particular de los aspectos anteriores de la divulgación, el CAF-AXL se usa junto con uno o más inhibidores de la vía MAPK, tal como al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa, para tratar el melanoma recurrente en un sujeto, cuando el melanoma reaparece después de un tratamiento inicial con un inhibidor de serina/treonina cinasa. En caso de que el cáncer reaparezca de nuevo después del tratamiento inicial con CAF-AXL, el CAF-AXL puede usarse de nuevo, junto con el al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa, para tratar el cáncer recurrente.

En un aspecto de la divulgación, la invención se refiere a un método de selección de un sujeto que padece un melanoma para su tratamiento con una combinación de un CAF-AXL y al menos un S/Th KI, que comprende determinar (a) si el sujeto cumple los criterios para el tratamiento con un S/Th KI; (b) si la expresión de AXL en el melanoma está asociada a la resistencia al S/Th KI; y (c) seleccionar a un sujeto que cumpla los criterios para el tratamiento con el S/Th KI y que padezca un melanoma en el que la expresión de AXL esté asociada a la resistencia al S/Th KI.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto al que se le ha diagnosticado un melanoma que es, o tiene una alta tendencia a ser, resistente a vemurafenib o a un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y al menos un inhibidor de la vía MAPK, tal como, p. ej., un inhibidor de serina/treonina cinasa.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto que padece melanoma es apto para el tratamiento con una combinación de (i) un BRAFi tal como vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, (ii) un MEKi tal como dabrafenib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, y (iii) un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, en donde el sujeto está recibiendo o ha recibido tratamiento con el BRAFi, el MEKi o ambos, y se determina o sospecha que es resistente al BRAFi, MEKi o ambos, determinando así que el sujeto es apto para el tratamiento. En otro aspecto de la divulgación puede determinarse si el melanoma expresa AXL.

En una realización de la divulgación, se ha determinado que el melanoma resistente que se va a tratar con un contra CAF-AXL expresa AXL.

En una realización particular de la divulgación, esto se consigue detectando los niveles de antígeno AXL o los niveles de células que expresan AXL en su superficie celular en una muestra, p. ej., una muestra de tumor tal como una biopsia, tomada de un paciente. El paciente puede, por ejemplo, padecer melanoma o estar en riesgo de desarrollar un melanoma. El antígeno AXL a detectar puede ser antígeno AXL soluble, antígeno AXL asociado a células, o ambos. La muestra a analizar puede, por ejemplo, ponerse en contacto con un anticuerpo contra AXL en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a la AXL, opcionalmente junto con una muestra de control y/o un anticuerpo de control que se una a un antígeno irrelevante. Después, puede detectarse la unión del anticuerpo a AXL (p. ej., utilizando un ELISA). Cuando se utilice una muestra de control junto con la muestra de ensayo, se analiza el nivel de anticuerpo

contra AXL o de complejo AXL anticuerpo contra-AXL en ambas muestras y un nivel superior estadísticamente significativo de anticuerpo contra AXL o de complejo AXL anticuerpo contra AXL en la muestra problema muestra un nivel superior de AXL en la muestra problema en comparación con la muestra de control, lo que indica una mayor expresión de AXL. Entre los ejemplos de inmunoensayos convencionales útiles para tales fines se incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia con plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia Western y/o inmunoprecipitación.

Una muestra de tejido puede tomarse de un tejido que se sabe o se sospecha que contiene antígeno AXL y/o células que expresan AXL. Por ejemplo, la detección *in situ* de la expresión de AXL puede realizarse extrayendo de un paciente una muestra histológica, tal como una biopsia tumoral o una muestra de sangre, y proporcionando el anticuerpo contra AXL a dicha muestra tras una preparación adecuada de la misma. El anticuerpo puede proporcionarse aplicando o superponiendo el anticuerpo a la muestra, que después se detecta utilizando medios adecuados.

En los ensayos anteriores, el anticuerpo contra AXL puede marcarse con una sustancia detectable para permitir la detección del anticuerpo unido a AXL.

El nivel de AXL expresado en las células de una muestra también puede determinarse de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 17, donde la expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se cuantificó por inmunofluorescencia indirecta mediante análisis QIFIKIT (DAKO, n.º de cat. K0078), utilizando un anticuerpo monoclonal contra AXL (en este caso: el anticuerpo monoclonal de ratón ab89224; Abeam, Cambridge, RU). Resumiendo, se prepara una suspensión unicelular y, opcionalmente, se lava. Las siguientes etapas se realizan en hielo. Se siembran las células, p. ej., a 100.000 células por pocillo o tubo, y posteriormente se sedimentan y resuspenden en 50 µl de muestra de anticuerpos a una concentración de 10 µg/ml, opcionalmente añadiendo un anticuerpo de control a una muestra paralela. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se sedimentan y se resuspenden en 150 µl de tampón FACS, y la cantidad de AXL se determina mediante análisis FACS utilizando, p. ej., un anticuerpo secundario, marcado con FITC, que se une a los anticuerpos contra AXL y de control. Para cada línea celular, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC, *antibody binding capacity*), una estimación del número de moléculas de AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó usando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpo contra AXL, basándose en la ecuación de una curva de calibración como se describe en el Ejemplo 23 (interpolación de incógnitas desde la curva estándar). En una realización, usando el método del Ejemplo 23, el nivel de AXL en las células que expresan AXL se estima en al menos 5000, tal como al menos 8000, tal como al menos 13000.

En una realización particular de la divulgación, la presencia o el nivel de células que expresan AXL en un melanoma se evalúa mediante la obtención de imágenes *in vivo* de anticuerpos contra AXL marcados de forma detectable de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Una señal significativamente más alta de un lugar, tal como el lugar que se conoce o sospecha de un tumor de melanoma, que el fondo u otro control indica sobreexpresión de AXL en el tumor.

CAF-AXL

Los CAF adecuados para su uso en el contexto de la presente invención pueden prepararse a partir de cualquier anticuerpo contra AXL, normalmente un anticuerpo que se une a una región extracelular de la AXL humana. En una realización de la divulgación, el anticuerpo contra AXL también se une a una región extracelular de la AXL de macaco cangrejero. Los anticuerpos contra AXL preferidos se caracterizan por una o más de las propiedades de unión a AXL, secuencias variables o hipervariables, o una combinación de propiedades de unión y secuencias, expuestas en los aspectos y realizaciones que se indican a continuación. En un aspecto particular de la divulgación, el anticuerpo se une a AXL pero no compite por la unión de AXL con el ligando 6 específico de la detención del crecimiento (Gas6). Lo más preferidos son los anticuerpos específicos contra AXL cuyas secuencias se describen en la Tabla 2, en particular el anticuerpo designado 107 y los anticuerpos que comparten una o más propiedades de unión a AXL o secuencias CDR, VH y/o VL con el anticuerpo 107.

Por tanto, en una realización particular de cualquier aspecto o realización anterior, el anticuerpo contra AXL comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40.

Preferentemente, el CAF comprende dicho anticuerpo contra AXL unido a un agente citotóxico que es una auristatina o un análogo o derivado peptídico funcional de la misma, tal como, p. ej., monometil auristatina E, preferentemente a través de un enlazador maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxi-carbonilo (mc-vc-PAB).

Particularmente preferido para los aspectos y realizaciones del presente documento es un CAF-AXL en donde el anticuerpo contra AXL es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa que comprende una región VH y una región VL, en donde la región VH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, y la región VL comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, opcionalmente, en donde las regiones VH y VL comprenden la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente, unida a la monometil auristatina E

mediante un enlazador maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxi-carbonilo (mc-vc-PAB). Dicho CAF-AXL puede denominarse también en el presente documento "HuMax-CAF-AXL" o "IgG1-AXL-107-vcMMAE".

El término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento pretende referirse a una molécula de inmunoglobulina, a un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o a un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas y/o en condiciones específicas de tumor habituales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como de al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada a la unión del anticuerpo al antígeno y/o un tiempo suficiente para que el anticuerpo se internalice). La región de unión (o el dominio de unión que puede usarse en el presente documento, teniendo ambos el mismo significado) que interactúa con un antígeno, comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente de la vía clásica de activación del complemento. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo como se utiliza en el presente documento, salvo que se especifique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de interactuar específicamente, tal como unirse, al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Como ejemplos de fragmentos de unión que abarca el término "anticuerpo" se incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO 2007/059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, 1989), que consiste esencialmente en un dominio VH y también se denomina anticuerpo de dominio (Holt *et al.*, 2003); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revets *et al.*, 2005) y (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Por otro lado, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes distintos, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv), véase por ejemplo Bird *et al.* (1988) y Huston *et al.* (1988). Dichos anticuerpos monocatenarios se incluyen en la expresión anticuerpo salvo que se indique lo contrario o lo indique claramente el contexto. Aunque dichos fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno de forma independiente son características únicas de la presente invención, exhibiendo diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan más detalladamente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se indique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, así como "fragmentos de anticuerpo" o "fragmentos del mismo" que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica y técnicas recombinantes, y conservando la capacidad de conjugarse con una toxina. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

La expresión "cadena pesada de inmunoglobulina" o "cadena pesada de una inmunoglobulina", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada normalmente comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada (abreviada en el presente documento como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de cadena pesada normalmente comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. El término "inmunoglobulina", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Al igual que las cadenas pesadas, cada cadena ligera comprende normalmente varias regiones; una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera normalmente comprende un dominio, CL. Por otro lado, las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en cuanto a la secuencia y/o tener forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR, *framework regions*). Cada VH y VL comprende normalmente tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las secuencias CDR se definen de acuerdo con el IMGT (véase Lefranc *et al.* (1999) y

Brochet *et al.* (2008)).

La expresión "región de unión a antígeno" o "región de unión" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula, tal como un polipéptido, p. ej., presente en una célula, bacteria o virión. Los términos "antígeno" y "diana" pueden, a menos que el contexto lo contradiga, usarse indistintamente en el contexto de la presente invención.

El término "unión" como se utiliza en el presente documento se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno o diana predeterminados, normalmente una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menor, p. ej., de 10^{-7} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menor, de aproximadamente 10^{-10} M o menor o de aproximadamente 10^{-11} M o incluso menor cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces inferior, tal como al menos 100 veces inferior, por ejemplo, al menos 1.000 veces inferior, tal como al menos 10.000 veces inferior, por ejemplo, al menos 100.000 veces inferior a su K_D de unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la K_D es inferior depende de la K_D del anticuerpo, de manera que, cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es inferior a la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. La expresión " K_D " (M), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, y se obtiene dividiendo k_d entre k_a . La afinidad, como se utiliza en el presente documento, y la K_D están inversamente relacionadas, es decir, mayor afinidad pretende referirse a menor K_D y menor afinidad pretende referirse a mayor K_D .

La expresión " k_d " (s^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina el valor k_{off} o de disociación.

La expresión " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. Dicho valor también se denomina el valor k_{on} o de asociación.

La expresión " K_A " (M^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo k_a entre k_d .

El término "AXL" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína con el nombre de AXL, que también se denomina UFO o JTK11, una proteína de 894 aminoácidos con un peso molecular de 104-140 kDa que forma parte de la subfamilia TAM de tirosina cinasas receptoras (RTK) de mamíferos. El peso molecular es variable debido a posibles diferencias en la glucosilación de la proteína. La proteína AXL consiste en dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (tipo Ig) en el extremo aminoterminal de la proteína, dos dominios de fibronectina tipo III (FNIII) extracelulares proximales a la membrana, un dominio transmembrana y un dominio cinasa intracelular. AXL se activa tras la unión de su ligando Gas6, mediante interacciones homofílicas independientes del ligando entre dominios extracelulares de AXL, por autofosforilación en presencia de especies reactivas del oxígeno (Korshunov *et al.*, 2012) o por transactivación a través de EGFR (Meyer *et al.*, 2013), y se expresa de forma aberrante en varios tipos tumorales. En seres humanos, la proteína AXL está codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 130 (proteína AXL humana: Swissprot P30530; proteína AXL de macaco cangrejero: registro de Genbank HB387229.1 (SEQ ID NO:147)).

La expresión "interacciones homofílicas independientes de ligando" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la asociación entre dos moléculas de AXL (expresadas en células vecinas) que se produce en ausencia del ligando.

La expresión "anticuerpo que se une a AXL" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier anticuerpo que se une a un epítipo en la parte extracelular de AXL.

El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar o una combinación de las mismas y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos que están directamente implicados en la unión y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente o están cubiertos por el péptido de unión a antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno).

El término "ligando", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia, tal como una hormona, péptido, ion, fármaco o proteína, que se une de forma específica y reversible a otra proteína, tal como un receptor,

para formar un complejo más grande. La unión del ligando a un receptor puede alterar su conformación química y determina su estado funcional. Por ejemplo, un ligando puede actuar como agonista o antagonista.

La expresión "6 específico de la detención del crecimiento" o "Gas6" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína de 721 aminoácidos, con un peso molecular de 75-80 kDa, que actúa como ligando para la familia de receptores TAM, incluida la AXL. Gas6 se compone de una región aminoterminal que contiene múltiples restos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), que son responsables de la interacción específica con la membrana fosfolipídica cargada negativamente. Aunque el dominio Gla no es necesario para la unión de Gas6 a AXL, se requiere para la activación de AXL. Gas6 también puede denominarse "ligando de AXL".

Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "mAb" o similares, se usan en el presente documento para referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad por un epítopo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcrómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionado a una célula inmortalizada.

En el contexto de la presente invención el término "CAF" se refiere a un conjugado de anticuerpo y fármaco, que en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo contra AXL que está acoplado a un residuo terapéutico, p. ej., un resto citotóxico como se describe en la presente solicitud. Puede acoplarse, p. ej., con un enlazador a, p. ej., cisteína o con otros métodos de conjugación a otros aminoácidos. El residuo puede ser, p. ej., un fármaco o una toxina o similar.

Como se utiliza en el presente documento, un "residuo terapéutico" significa un compuesto que ejerce un efecto terapéutico o preventivo cuando se administra a un sujeto, particularmente cuando se suministra como un CAF como se describe en el presente documento. Un residuo "citotóxico" o "citostático" es un compuesto que es perjudicial para las células (p. ej., que produce su muerte). Algunos residuos citotóxicos o citostáticos para su uso en los CAF son hidrófobos, lo que significa que tienen una solubilidad limitada o nula en agua, p. ej., 1 g/l o menor (muy ligeramente soluble), tal como 0,8 g/l o menor, tal como 0,6 g/l o menor, tal como 0,4 g/l o menor, tal como 0,3 g/l o menor, tal como 0,2 g/l o menor, tal como 0,1 g/l o menos (prácticamente insoluble). Como residuos citotóxicos o citostáticos hidrófobos ilustrativos se incluyen, pero sin limitación, determinados inhibidores de la microtubulina tales como auristatina y sus derivados, p. ej., MMAF y MMAE, así como maitansina y sus derivados, p. ej., DM1.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo tiene una afinidad de unión (K_D) por AXL comprendida en el intervalo de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M y en donde dicha afinidad de unión se mide usando una interferometría de biocapa utilizando el dominio extracelular soluble de AXL.

La afinidad de unión puede determinarse como se describe en el Ejemplo 2. Por tanto, en una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión por el antígeno de $0,3 \times 10^{-9}$ a 63×10^{-9} M, en donde la afinidad de unión se determina mediante un método que comprende las siguientes etapas;

i) cargar biosensores de captura contra la región Fc humana con anticuerpos contra AXL, y
ii) determinar la asociación y disociación del dominio extracelular de AXL recombinante soluble mediante interferometría de biocapa a diferentes concentraciones.

La expresión "dominio extracelular de AXL recombinante soluble" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un dominio extracelular AXL, correspondiente a los aminoácidos 1-447 de la proteína de longitud completa (SEQ ID NO:130; véase el Ejemplo 1) que se ha expresado de forma recombinante. Debido a la ausencia del dominio transmembrana e intracelular, el dominio extracelular de AXL recombinante no está unido a, p. ej., la superficie celular y permanece en solución. Se sabe cómo expresar una proteína de forma recombinante, véase, p. ej., Sambrook (1989), y por tanto, el experto sabe cómo proporcionar dicho dominio extracelular AXL recombinante.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo tiene una velocidad de disociación de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ con respecto a AXL, y en donde la velocidad de disociación se mide por interferometría de biocapa usando el dominio extracelular de AXL recombinante soluble.

Opcionalmente, el anticuerpo tiene una velocidad de disociación de $9,7 \times 10^{-5}$ a $4,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ con respecto a AXL, y en donde la velocidad de disociación se mide por interferometría de biocapa utilizando el dominio extracelular recombinante soluble de AXL.

La afinidad de unión puede determinarse como se ha descrito anteriormente (y en el Ejemplo 2). Por tanto, en una realización, el anticuerpo tiene una velocidad de disociación de $6,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ con respecto a AXL, y en donde la velocidad de disociación se mide mediante un método que comprende las siguientes etapas

i) cargar biosensores de captura contra la región Fc humana con anticuerpos contra AXL, y

ii) determinar la asociación y disociación del dominio extracelular de AXL recombinante mediante interferometría de biocapa a diferentes concentraciones.

La expresión "velocidad de disociación" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la velocidad a la que un anticuerpo específico de antígeno se une a su antígeno, se disocia de ese antígeno, y se expresa como s^{-1} . Por tanto, en el contexto de un anticuerpo de unión a AXL, la expresión "velocidad de disociación", se refiere a que el anticuerpo que une AXL se disocia del dominio extracelular recombinante de AXL, y se expresa como s^{-1} .

En un aspecto de la divulgación, los CAF que se utilizan en la presente invención comprenden una porción de anticuerpo que se une a un dominio extracelular de AXL sin competir o interferir con la unión de Gas6 a AXL. En una realización particular de la divulgación, el anticuerpo se une al dominio extracelular de Ig1 sin competir o interferir con la unión de Gas6 a AXL. En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une al dominio extracelular de Ig1 y muestra una reducción no superior a 20 % en la unión máxima de Gas6 a AXL. En una realización de la divulgación, el anticuerpo muestra una reducción no superior a 15 % en la unión máxima de Gas6 a AXL. En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une al dominio de Ig2 en el dominio extracelular de AXL y muestra una reducción no superior a 20 %, tal como no superior a 15 %, tal como no superior a 10 %, tal como no superior a 5 %, tal como no superior a 4 %, tal como no superior a 2 %, tal como no superior a 1 %, en la unión máxima de Gas6 a AXL. La capacidad de la realización para competir con la unión a Gas6 o reducirla puede determinarse como se ha divulgado en el Ejemplo 2 o en el Ejemplo 12. En una realización, el anticuerpo se une al dominio de Ig2 en el dominio extracelular de AXL sin competir o interferir con la unión máxima de Gas6 a AXL.

En una realización, la unión máxima del anticuerpo en presencia de Gas6 es de al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 %, tal como de 100 %, de unión en ausencia de Gas6, determinado mediante un ensayo de competencia, en donde la competencia entre dicho anticuerpo que se une a la AXL humana y dicho Gas6 se determina en células A431 preincubadas con Gas6 y sin Gas6.

La competencia entre el anticuerpo contra AXL y el ligando Gas6 con respecto a AXL puede determinarse como se describe en el Ejemplo 2 con el título "Interferencia de unión contra AXL con la unión a Gas6". Por tanto, en una realización de la divulgación, el anticuerpo no compite con el ligando Gas6 por la unión a AXL, en donde la competencia por la unión se determina en un ensayo que comprende las siguientes etapas

- i) incubar con Gas6 células que expresen AXL,
- ii) añadir anticuerpos contra AXL a analizar,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado con fluorescencia que detecte anticuerpos contra AXL y
- iv) analizar las células mediante FACS.

En otra realización, el anticuerpo no compite con el ligando Gas6 por la unión, en donde la competencia por la unión se determina en un ensayo que comprende las siguientes etapas

- i) incubar con anticuerpos contra AXL células que expresen AXL,
- ii) añadir Gas6,
- iii) añadir un reactivo secundario marcado con fluorescencia que detecte Gas6, y
- iv) analizar las células mediante FACS.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo modula la señalización asociada a AXL en una célula que expresa AXL cuando la célula entra en contacto con el anticuerpo.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo no modula la señalización asociada a AXL en una célula que expresa AXL cuando la célula entra en contacto con el anticuerpo.

Como ejemplos no limitativos de modulación de señalización asociada a AXL se incluyen la modulación de vías de señalización intracelular tales como las cascadas de PI3K/AKT, de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), STAT o NF- κ B.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo contra AXL o el CAF-AXL compite por la unión a AXL con un anticuerpo que comprende una región variable pesada (VH, *variable heavy*) y una región variable ligera (VL, *variable light*) seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:2 [107];
- (b) una región VH que comprende la SEQ ID NO:5 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:6 [148];
- (c) una región VH que comprende la SEQ ID NO:34 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:35 [733]

- (d) una región VH que comprende la SEQ ID NO:7 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154]**;
 (e) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 11 **[171]**;
 (f) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18 **[183]**;
 (g) una región VH que comprende la SEQ ID NO:25 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:26 **[613]**;
 5 (h) una región VH que comprende la SEQ ID NO:31 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726]**;
 (i) una región VH que comprende la SEQ ID NO:3 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:4 **[140]**;
 (j) una región VH que comprende la SEQ ID NO:8 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154-M103L]**;
 (k) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 13 **[172]**;
 (l) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 15 **[181]**;
 10 (m) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;
 (n) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 20 **[187]**;
 (o) una región VH que comprende la SEQ ID NO:21 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
 (p) una región VH que comprende la SEQ ID NO:23 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
 15 (q) una región VH que comprende la SEQ ID NO:27 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:28 **[613-08]**;
 (r) una región VH que comprende la SEQ ID NO:29 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:30 **[620-06]**; y
 (s) una región VH que comprende la SEQ ID NO:32 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726-M101L]**.
- 20 Cuando la expresión "compite con" o "compite de forma cruzada con" se utiliza en el presente documento en el contexto de un anticuerpo y un ligando Gas6 o en el contexto de dos o más anticuerpos, indica que el anticuerpo compete con el ligando u otro anticuerpo, p. ej., un anticuerpo de "referencia" en la unión a un antígeno, respectivamente. En el Ejemplo 2 se describe un ejemplo de cómo analizar la competición de un anticuerpo contra AXL con el ligando Gas6-AXL. Los anticuerpos de referencia preferidos para la competición cruzada entre dos anticuerpos son aquellos que comprenden una región de unión que comprende la región VH y la región VL de un anticuerpo designado en el presente documento 107, 148, 733, 154, 171, 183, 613, 726, 140, 154-M103L, 172, 181, 183-N52Q, 187, 608-01, 610-01, 613-08, 620-06 o 726-M101L, como se expone en la Tabla 4. Un anticuerpo de referencia particularmente preferido es el anticuerpo designado 107.
- 30 En una realización de la divulgación, el anticuerpo contra AXL se une al mismo epítipo en AXL que uno cualquiera o más de los anticuerpos de acuerdo con la realización mencionada anteriormente, como se define por sus secuencias VH y VL, p. ej., una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:2 **[107]**.
- 35 En la técnica se conoce bien métodos para determinar un epítipo al que se une un anticuerpo. Por tanto, el experto sabría cómo determinar dicho epítipo. Sin embargo, un ejemplo para determinar si un anticuerpo se une dentro de cualquier epítipo descrito en el presente documento puede ser a través de la introducción de mutaciones puntuales en el dominio extracelular de AXL, p. ej., con el fin de identificar cuáles son los aminoácidos que están implicados en la unión del anticuerpo con el antígeno. El experto sabe cómo introducir una o más mutaciones puntuales en el dominio extracelular de AXL y analizar la unión de los anticuerpos con los dominios extracelulares de AXL que tengan mutaciones puntuales, ya que se espera que el efecto de las mutaciones puntuales sobre la estructura 3D global sea mínimo.
- 40 En el Ejemplo 3 se utilizó un método alternativo, en donde la especificidad del dominio de AXL se mapeó preparando un panel de mutantes de AXL quiméricos de ser humano-ratón en donde el dominio de Ig1, Ig2, FN1 o FN2 de ser humano se había sustituido por su análogo murino, y determinando a qué mutante se unía un anticuerpo contra AXL. Este método se basaba en el principio de que estos anticuerpos humanos específicos de AXL reconocían la AXL de ser humano pero no la de ratón. Por tanto, en realizaciones distintas y específicas de la divulgación, el anticuerpo se une al dominio Ig1 de AXL, al dominio Ig2 de AXL, al dominio FN1 de AXL o al dominio FN2 de AXL.
- 45 Un método de mapeado de epítipos de más alta resolución, que identifica cuáles son los aminoácidos del dominio extracelular de AXL que están implicados en la unión con el anticuerpo, también se usó en este Ejemplo. Específicamente, este método analizó la unión del anticuerpo contra AXL con una biblioteca de variantes de secuencia de AXL generada mediante recombinación de secuencias de AXL derivadas de especies con niveles variables de homología con la secuencia de AXL humana (SEQ ID NO: 130) en el dominio extracelular. Este método se basó en el principio de que estos anticuerpos humanos específicos de AXL reconocen la AXL humana, pero no la AXL de ninguna de las otras especies usadas en el ejemplo.
- 50 Por tanto, en una realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de AXL, y la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o uno o más o todos de T112 a Q124 de la AXL humana, en donde la numeración de los restos de aminoácidos se refiere a sus respectivas posiciones en la AXL humana (SEQ ID NO: 130). En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de AXL, y la unión del anticuerpo depende de los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de la AXL humana. En una realización preferida de la divulgación, la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos los aminoácidos en la posición L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 y Q129, que corresponde a los aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo designado como 107 en el presente documento. En una realización de la divulgación, la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos
- 55 60 65

los aminoácidos en la posición T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 y Q124.

En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig2 de AXL, y la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a la posición D170 o la combinación de D179 o uno o más o todos los aminoácidos en las posiciones T182 a R190 de la AXL humana. En una realización de la divulgación, la unión del anticuerpo depende de los aminoácidos en la posición T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 y R190.

En otra realización, el anticuerpo se une al dominio FN1 de la AXL humana y la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de la AXL humana. En una realización de la divulgación, la unión del anticuerpo depende de los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de la AXL humana.

En otra realización, el anticuerpo se une al dominio FN2 de la AXL humana y la unión del anticuerpo depende de uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones A359, R386 y Q436 a K439 de la AXL humana.

En otra realización más, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de la AXL, y el epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o uno o más o todos de T112 a Q124 de la AXL humana, en donde la numeración de los restos de aminoácidos se refiere a sus respectivas posiciones en la AXL humana (SEQ ID NO: 130). En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de la AXL, y el epítipo comprende o requiere los aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de la AXL humana. En una realización preferida de la divulgación, el epítipo comprende uno o más o todos los aminoácidos en la posición L121, G122, H123, Q124, T125, F126, V127, S128 y Q129, que corresponde a los aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo designado como 107 en el presente documento. En una realización de la divulgación, el epítipo comprende uno o más o todos los aminoácidos en la posición T112, G113, Q114, Y115, Q116, C117, L118, V119, F120, L121, G122, H123 y Q124.

En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig2 de la AXL, y el epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a la posición D170 o la combinación de D179 o uno o más o todos los aminoácidos en las posiciones T182 a R190 de la AXL humana. En una realización el epítipo de la divulgación, el epítipo comprende o requiere los aminoácidos en la posición T182, A183, P183, G184, H185, G186, P187, Q189 y R190.

En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio FN1 de la AXL humana, cuyo epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de la AXL humana. En una realización de la divulgación, el epítipo comprende o requiere los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 y G297 a P301 de la AXL humana.

En otra realización, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio FN2 de la AXL humana, cuyo epítipo comprende o requiere uno o más o todos los aminoácidos correspondientes a las posiciones A359, R386 y Q436 a K439 de la AXL humana.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio similar a FN1 de la AXL humana.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo en AXL cuyo epítipo es reconocido por uno cualquiera de los anticuerpos definidos por

a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;

b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**;

c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente **[733]**;

d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154]**;

e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154-M103L]**;

f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente, **[171]**;

g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 62, 63 y 64,

respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 65, GAS y 66, respectivamente, **[172]**;

h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 70, GAS y 71, respectivamente, **[181]**;

i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;

j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;

k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 81, AAS y 82, respectivamente, **[187]**;

l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente, **[608-01]**;

m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;

n) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;

o) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 10, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;

p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**;

q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726]**;

r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;

s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente, **[140]**;

t) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613 / 613-08]**;

u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148 / 140]**;

v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente **[171 / 172 / 181]**; y

w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente **[726 / 187]**; y

x) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente **[613 / 608-01 / 610-01 / 620-06]**.

En una realización particular de la divulgación, el anticuerpo se une a un epítipo en AXL cuyo epítipo es reconocido por uno cualquiera de los anticuerpos definidos que comprende un región de unión que comprende las secuencias VH y VL de un anticuerpo seleccionado de los designados en el presente documento como 107, 061, 137, 148, 154-M103L, 171, 183-N52Q, 511, 613, 726-M102L y 733. Como se muestra en el Ejemplo 16, estos anticuerpos contra AXL se internalizan y por tanto son adecuados para una estrategia de CAF.

En una realización, el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;

- (b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**;
- 5 (c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente **[733]**;
- (d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154]**;
- 10 (e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154-M103L]**;
- (f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente, **[171]**;
- 15 (g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 65, GAS y 66, respectivamente, **[172]**;
- (h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 70, GAS y 71, respectivamente, **[181]**;
- 20 (i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;
- 25 (j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;
- (k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 81, AAS y 82, respectivamente, **[187]**;
- 30 (l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente, **[608-01]**;
- (m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;
- 35 (n) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 40 (o) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- (p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**;
- 45 (q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726]**;
- (r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;
- 50 (s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente, **[140]**;
- 55 (t) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613 / 613-08]**;
- (u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148 / 140]**;
- 60 (v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente **[171 / 172 / 181]**; y
- 65 (w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente **[726 / 187]**; y

- (x) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente **[613 / 608-01 / 610-01 / 620-06]**.

5 En una realización, el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:2 **[107]**;
 (b) una región VH que comprende la SEQ ID NO:5 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:6 **[148]**;
 10 (c) una región VH que comprende la SEQ ID NO:34 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:35 **[733]**;
 (d) una región VH que comprende la SEQ ID NO:7 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154]**;
 (e) una región VH que comprende la SEQ ID NO:10 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:11 **[171]**;
 (f) una región VH que comprende la SEQ ID NO:16 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:18 **[183]**;
 (g) una región VH que comprende la SEQ ID NO:25 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:26 **[613]**;
 15 (h) una región VH que comprende la SEQ ID NO:31 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726]**;
 (i) una región VH que comprende la SEQ ID NO:3 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:4 **[140]**;
 (j) una región VH que comprende la SEQ ID NO:8 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154-M103L]**;
 (k) una región VH que comprende la SEQ ID NO:12 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:13 **[172]**;
 (l) una región VH que comprende la SEQ ID NO:14 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:15 **[181]**;
 20 (m) una región VH que comprende la SEQ ID NO:17 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:18 **[183-N52Q]**;
 (n) una región VH que comprende la SEQ ID NO:19 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:20 **[187]**;
 (o) una región VH que comprende la SEQ ID NO:21 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
 (p) una región VH que comprende la SEQ ID NO:23 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
 25 (q) una región VH que comprende la SEQ ID NO:27 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:28 **[613-08]**;
 (r) una región VH que comprende la SEQ ID NO:29 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:30 **[620-06]**; y
 (s) una región VH que comprende la SEQ ID NO:32 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726-M101L]**.

30 La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH o una o más CDR de los anticuerpos mencionados anteriormente. Una variante funcional de una VL, VH o CDR usadas en el contexto de un anticuerpo anti-AXL sigue permitiendo que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (de al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original y, en algunos casos, dicho anticuerpo contra
 35 AXL puede estar asociado a una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

Dichas variantes funcionales normalmente conservan una identidad de secuencia significativa con respecto al anticuerpo original. El porcentaje de identidad entre dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones \times 100),
 40 teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, que se conoce bien en la técnica.

La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, utilizando el
 45 algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle marcada como "identidad más larga" (obtenida usando la
 50 opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Restos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de la Alineación} - \text{Número Total de Huecos en la Alineación}).$$

Las secuencias VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias del anticuerpo original
 55 mediante sustituciones mayoritariamente conservativas; por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, (p. ej., aproximadamente el 65-95 %, tal como aproximadamente el 92 %, 93 % o 94 %) de las sustituciones en la variante, son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

Las secuencias VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias del anticuerpo original
 60 mediante sustituciones mayoritariamente conservativas; por ejemplo 10 o menos, tal como 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 de las sustituciones en la variante, son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

65 También se proporcionan realizaciones en donde se permiten mutaciones o sustituciones de hasta cinco mutaciones

o sustituciones a lo largo de las tres secuencias CDR de la cadena pesada variable y/o de la cadena ligera variable de la realización anterior. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones, pueden distribuirse a lo largo de las tres secuencias CDR de la cadena pesada variable y las tres secuencias CDR de la cadena ligera variable. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones pueden distribuirse entre las seis secuencias CDR de la región de unión. Las mutaciones o sustituciones pueden ser de aminoácidos física o funcionalmente conservativos, de tal manera que las mutaciones o sustituciones no cambien el epítipo o, preferentemente, no modifiquen la afinidad de unión con el epítipo más de un 30 %, tal como más de un 20 % o tal como más de un 10 %. Los aminoácidos física o funcionalmente conservativos se seleccionan de los 20 aminoácidos naturales que se encuentran, es decir, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val.

Por tanto, en una realización, el anticuerpo anti-AXL comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en secuencias VH y VL al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 % idénticas a:

- (a) una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:2 **[107]**;
- (b) una región VH que comprende la SEQ ID NO:5 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:6 **[148]**;
- (c) una región VH que comprende la SEQ ID NO:34 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:35 **[733]**;
- (d) una región VH que comprende la SEQ ID NO:7 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154]**;
- (e) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 11 **[171]**;
- (f) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18 **[183]**;
- (g) una región VH que comprende la SEQ ID NO:25 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:26 **[613]**;
- (h) una región VH que comprende la SEQ ID NO:31 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726]**;
- (i) una región VH que comprende la SEQ ID NO:3 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:4 **[140]**;
- (j) una región VH que comprende la SEQ ID NO:8 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154-M103L]**;
- (k) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 13 **[172]**;
- (l) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 14 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 15 **[181]**;
- (m) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18 **[183-N52Q]**;
- (n) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 20 **[187]**;
- (o) una región VH que comprende la SEQ ID NO:21 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
- (p) una región VH que comprende la SEQ ID NO:23 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
- (q) una región VH que comprende la SEQ ID NO:27 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:28 **[613-08]**;
- (r) una región VH que comprende la SEQ ID NO:29 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:30 **[620-06]**; y
- (s) una región VH que comprende la SEQ ID NO:32 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726-M101L]**.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, de la región VH, o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una VL, VH o CDR usadas en el contexto de un anticuerpo anti-AXL sigue permitiendo que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (de al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original y, en algunos casos, dicho anticuerpo contra AXL puede estar asociado a una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

Dichas variantes funcionales normalmente conservan una identidad de secuencia significativa con respecto al anticuerpo original. El porcentaje de identidad entre dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones \times 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, que se conoce bien en la técnica.

Las secuencias VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias del anticuerpo original mediante sustituciones mayoritariamente conservativas; por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, (p. ej., aproximadamente el 65-95 %, tal como aproximadamente el 92 %, 93 % o 94 %) de las sustituciones en la variante, son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

Las secuencias VH, VL y/o CDR de las variantes pueden diferir de las de las secuencias del anticuerpo original mediante sustituciones mayoritariamente conservativas; por ejemplo 10 o menos, tal como 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 de las sustituciones en la variante, son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

También se proporcionan realizaciones de la divulgación en donde se permiten mutaciones o sustituciones de hasta cinco mutaciones o sustituciones a lo largo de las tres secuencias CDR en la cadena pesada variable y/o cadena ligera variable de la realización anterior. Las hasta cinco mutaciones o sustituciones, pueden distribuirse a lo largo de las tres secuencias CDR de la cadena pesada variable y las tres secuencias CDR de la cadena ligera variable. Las hasta

cinco mutaciones o sustituciones pueden distribuirse entre las seis secuencias CDR de la región de unión. Las mutaciones o sustituciones pueden ser de aminoácidos física o funcionalmente conservativos, de tal manera que las mutaciones o sustituciones no cambien el epítipo o, preferentemente, no modifiquen la afinidad de unión con el epítipo más de un 30 %, tal como más de un 20 % o tal como más de un 10 %. Los aminoácidos física o funcionalmente conservativos se seleccionan de los 20 aminoácidos naturales que se encuentran, es decir, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo anti-AXL comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en secuencias VH y VL al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 % idénticas a:

- (t) una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:2 **[107]**;
- (u) una región VH que comprende la SEQ ID NO:5 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:6 **[148]**;
- (v) una región VH que comprende la SEQ ID NO:34 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:35 **[733]**;
- (w) una región VH que comprende la SEQ ID NO:7 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154]**;
- (x) una región VH que comprende la SEQ ID NO:10 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:11 **[171]**;
- (y) una región VH que comprende la SEQ ID NO:16 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:18 **[183]**;
- (z) una región VH que comprende la SEQ ID NO:25 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:26 **[613]**;
- (aa) una región VH que comprende la SEQ ID NO:31 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726]**;
- (bb) una región VH que comprende la SEQ ID NO:3 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:4 **[140]**;
- (cc) una región VH que comprende la SEQ ID NO:8 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:9 **[154-M103L]**;
- (dd) una región VH que comprende la SEQ ID NO:12 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:13 **[172]**;
- (ee) una región VH que comprende la SEQ ID NO:14 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:15 **[181]**;
- (ff) una región VH que comprende la SEQ ID NO:17 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:18 **[183-N52Q]**;
- (gg) una región VH que comprende la SEQ ID NO:19 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:20 **[187]**;
- (hh) una región VH que comprende la SEQ ID NO:21 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:22 **[608-01]**;
- (ii) una región VH que comprende la SEQ ID NO:23 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:24 **[610-01]**;
- (jj) una región VH que comprende la SEQ ID NO:27 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:28 **[613-08]**;
- (kk) una región VH que comprende la SEQ ID NO:29 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:30 **[620-06]**;
- y
- (ll) una región VH que comprende la SEQ ID NO:32 y una región VL que comprende la SEQ ID NO:33 **[726-M101L]**.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende las secuencias VH y VL CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo contra AXL conocido en la técnica, p. ej., un anticuerpo descrito en cualquiera de los siguientes documentos Leconet *et al.* (2013), Li *et al.* (2009), Ye *et al.* (2010), lida *et al.* (2014), WO 2012/175691 (INSERM), WO 2012/175692 (INSERM), WO 2013/064685 (Pierre Fabre Medicaments), WO 2013/090776 (INSERM), WO 2009/063965 (Chugai Pharmaceuticals), WO 2010/131733, WO 2011/159980 (Genentech), WO09062690 (U3 Pharma), WO2010130751 (U3 Pharma), WO2014093707 (Stanford University) y EP2228392A1 (Chugai). En una realización específica de la divulgación, el anticuerpo es el anticuerpo murino 1613F12 o una variante quimérica o humanizada del mismo, como se describe en el documento WO2014174111 (Pierre Fabre Medicament), en donde las secuencias VH y VL del anticuerpo de ratón 1613F12 se presentan como SEQ ID:8 y SEQ ID:7, respectivamente. La secuencia VH de la variante de anticuerpo humanizado de 1613F12 se selecciona de las secuencias divulgadas en el mismo como SEQ ID NO:29 a 49 y SEQ ID NO:82, y la secuencia VL de la variante de anticuerpo humanizado de 1613F12 se selecciona de las secuencias divulgadas en el mismo como SEQ ID NO:17 a 28 y SEQ ID: 81. Un anticuerpo específico comprende las secuencias VH y VL divulgadas en el mismo como SEQ ID NO:29 y 17, respectivamente. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo 1613F12 de ratón, quimérico y humanizado, son SEQ ID NO:4, 5 y 6, respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del anticuerpo 1613F12 de ratón y humanizado se divulgan en el mismo como SEQ ID NO:1, 2 y 3, respectivamente. En una realización específica de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo descrito en el documento WO2011159980 (Hoffman-La Roche), en particular en los párrafos [0127] a [0229] (páginas 28-52). Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender las regiones hipervariables (HVR, *hypervariable regions*) VH y VL, o las regiones VH y VL, del anticuerpo YW327.6S2, que se divulgan en el mismo como SEQ ID NO:7, 8 y 9 (VH HVR1, 2 y 3, respectivamente), SEQ ID NO:10, 11 y 12 (VL HVR1, 2 y 3, respectivamente) y SEQ ID NO:103 y 104 (secuencias VH y VL, respectivamente).

En una realización de la divulgación, el anticuerpo actúa como mediador en el entrecruzamiento o agrupamiento mediado por anticuerpos (p. ej., debido a que la región Fc de los anticuerpos unidos a AXL se une a células que expresan FcR) de moléculas de AXL en la superficie de una célula, lo que puede conducir a la apoptosis de la célula.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo induce una respuesta celular dependiente de Fc tal como una respuesta de ADCC (siglas del inglés, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) o ADCP (siglas del inglés, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos) contra una célula que expresa AXL después de la unión del anticuerpo específico de AXL a la membrana plasmática de la célula que expresa AXL en presencia de células efectoras. En esta realización, la porción de anticuerpo del anticuerpo es normalmente de longitud completa y de un isotipo que conduce a una respuesta ADCC o ADCP, tal como, p. ej., un isotipo IgG1,k.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo induce una respuesta CDC contra una célula que expresa AXL después de la unión del anticuerpo específico de AXL a la membrana plasmática de la célula que expresa AXL en presencia de proteínas del complemento, tales como las proteínas del complemento presentes en el suero humano normal, que pueden activarse. En esta realización, el anticuerpo es normalmente de longitud completa y de un isotipo capaz de inducir la activación del sistema del complemento, tal como, p. ej., un isotipo IgG1,k.

El anticuerpo y/o CAF puede caracterizarse también por que se internaliza al unirse a AXL. En consecuencia, en una realización de la divulgación, el anticuerpo y/o CAF se internaliza y transporta a los lisosomas para la escisión proteolítica específica (es decir, del enlazador escindible) o no específica (del enlazador no escindible) del complejo anticuerpo contra AXL-enlazador-fármaco.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo interfiere en la regulación de la respuesta inmunitaria innata o adaptativa mediada por AXL, tal como a través de unión del anticuerpo a macrófagos, a células dendríticas o a linfocitos NK que expresan AXL.

En una realización de la divulgación, el residuo terapéutico del CAF está enlazado al residuo del anticuerpo mediante un enlazador que permite la liberación del fármaco una vez que el CAF se internaliza, p. ej., por un cambio en el pH o en las condiciones reductoras. En la técnica se conoce la tecnología adecuada de enlazadores, como se describe en el presente documento.

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El término "isotipo" como se utiliza en el presente documento se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) o a cualquier alotipo de la misma, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f)) que está codificado por genes de la región constante de cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (k) o lambda (λ).

En una realización, el isotipo es IgG1, tal como IgG1 humana, opcionalmente el alotipo IgG1m(f).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de longitud completa, opcionalmente, un anticuerpo monoclonal de IgG1,k humano de longitud completa.

Cuando en el presente documento se utiliza la expresión "anticuerpo de longitud completa", se refiere a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo original o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras correspondientes a los que se encuentran normalmente en un anticuerpo de tipo natural de ese isotipo. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante un método que comprende las etapas de (i) clonar las secuencias de CDR en un vector adecuado que comprende secuencias de cadena pesada completas y secuencias de cadena ligera completa y (ii) expresar las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera completas en sistemas de expresión adecuados. El experto sabe cómo producir un anticuerpo de longitud completa partiendo de secuencias CDR o secuencias completas de regiones variables. Por tanto, el experto sabría cómo generar un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humano.

La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y estructurales derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana y un dominio constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (p. ej., mutaciones, inserciones o deleciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie no humana, tal como un ratón, se han injertado en secuencias estructurales humanas.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano "deriva de" una secuencia de la estirpe germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, inmunizando a un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana o seleccionando una genoteca de inmunoglobulina humana, y en donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos 90 %, tal como al menos 95 %, por ejemplo al menos 96 %, tal como al menos 97 %, por ejemplo, al menos 98 %, o al menos 99 %, idéntico en cuanto a la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal. Normalmente, fuera de la CDR3 de la cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la estirpe germinal humana no mostrará más de 20 diferencias de aminoácidos, p.ej. no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 9, 8, 7, 6 o 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede comprender modificaciones de aminoácidos en las cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina. En una realización particular, los aminoácidos de la región Fc del anticuerpo pueden modificarse.

5 La expresión "región Fc", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región que comprende, en la dirección desde el extremo amino (N) al carboxilo (C) del anticuerpo, al menos una región de bisagra, una región CH2 y una región CH3. Una región Fc puede actuar como mediadora en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento.

10 La expresión "región bisagra" como se utiliza en el presente documento a se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por tanto, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo de IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración de la UE como se expone en Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región bisagra también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

15 La expresión "región CH1" o "dominio CH1", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por tanto, por ejemplo, la región CH1 de un anticuerpo de IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 118-215 de acuerdo con la numeración de la UE como se expone en Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH1 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

20 La expresión "región CH2" o "dominio CH2", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por tanto, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo de IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 231-340 de acuerdo con la numeración Eu expuesta en Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

25 La expresión "región CH3" o "dominio CH3", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por tanto, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo de IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con la numeración de la UE como se expone en Kabat *et al.* (1991). Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

30 En otra realización de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo con deficiencia de función efectora, un anticuerpo de IgG4 estabilizado o un anticuerpo monovalente.

En una realización particular de la divulgación, la cadena pesada se ha modificado de tal manera que se ha delecionado toda la región de bisagra.

35 En una realización de la divulgación, la secuencia del anticuerpo se ha modificado de modo que no comprende ningún lugar aceptor para la glucosilación ligada a N.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.

40 En otro aspecto, la presente divulgación e invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo cualquier aspecto o realización descritos en el presente documento, y una segunda región de unión que se une a una diana o a un epítipo diferente de la primera región de unión. La expresión "anticuerpo multiespecífico" como se utiliza en el presente documento, se refiere a anticuerpos en donde las regiones de unión se unen a al menos dos, tal como al menos tres, antígenos diferentes o al menos dos, tal como al menos tres, diferentes epítopos en el mismo antígeno.

45 En una realización, la presente divulgación se refiere al uso de un CAF que comprende un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realizaciones descritos en el presente documento, y una segunda región de unión que se une a una diana o a un epítipo diferente a la de (al de) la primera región de unión.

50 El término "biespecífico" como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de unión, tales como anticuerpos en donde las regiones de unión de la molécula de unión se unen a dos antígenos diferentes o a dos epítopos diferentes del mismo antígeno.

55 La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades por al menos dos epítopos diferentes, normalmente no solapantes. Dichos epítopos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes. Si los epítopos están en dianas diferentes, dichas dianas pueden estar en la misma célula o en células, tipos de células o estructuras diferentes, tal como tejido extracelular.

60 La expresión "diana diferente" como se utiliza en el presente documento, se refiere a otra proteína, molécula o similar

distinta de AXL o de un fragmento de AXL.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpos biespecíficos que pueden usarse en la presente invención comprenden (i) un anticuerpo sencillo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno, (ii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad por dos epítopos diferentes, p. ej., mediante dos scFv enlazados en tándem por un péptido enlazador adicional; (iii) un anticuerpo de doble dominio variable (DVD-Ig™), donde cada cadena ligera y cada cadena pesada contienen dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu *et al.*, 2010); (iv) un fragmento biespecífico (Fab')₂ químicamente ligado; (v) aTandab®, que es una fusión de dos diacuerpos monocatenarios que da lugar a un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vi) un flexicuerpo, que es una combinación de los scFv con un diacuerpo que da lugar a una molécula multivalente; (vii) una molécula denominada de "acoplamiento y cerradura" (Dock-and-Lock®), basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la proteína cinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede dar lugar a una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos enlazados a un fragmento Fab diferente; (viii) la llamada molécula Escorpión, que comprende, p. ej., dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es un diacuerpo, un cuerpo cruzado, tales como los Mab entrecruzados (*CrossMab*), o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado del brazo Fab (como se describe en el documento WO 2011/131746, Genmab A/S).

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, aunque sin limitación, (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas recombinantes de doble direccionamiento similares a IgG, en donde cada uno de los dos lados de la molécula contiene fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos de IgG de longitud completa se fusionan con fragmentos Fab o partes de fragmentos Fab adicionales; (iv) moléculas de fusión Fc, en donde moléculas Fv monocatenarias o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, a regiones de Fc o a partes de los mismos; (v) moléculas de fusión de Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan entre sí, se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, a regiones de Fc o a partes de los mismos; y (vi) anticuerpos de cadena pesada y basados en ScFv y en diacuerpos (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) en donde diferentes moléculas Fv monocatenarias o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej. anticuerpos de dominio, Nanobodies®) se fusionan entre sí o con otra proteína o molécula transportadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, a regiones Fc o a partes de los mismos.

Los ejemplos de moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios incluyen, pero sin limitación, el Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, documento WO/2002/020039), Botones en oiales (*Knobs-into-Holes*) (Genentech, documento WO9850431), Mab entrecruzados (Roche, documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), moléculas Fc-heterodiméricas emparejadas electrostáticamente (Amgen, documentos EP1870459 y WO2009089004; Chugai, documento US201000155133; Oncomed, documento WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body, PIG-body y TIG-body (Pharmabicine), Cuerpo de dominio diseñado de intercambio de cadenas (SEEDbody, *Strand Exchange Engineered Domain body*) (EMD Serono, documento WO2007110205), IgG1 y IgG2 biespecíficas (Pfizer/Rinat, documento WO11143545), armazón asimétrico (Zymeworks/Merck, documento WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, documento WO2011028952), XmAb (Xencor), anticuerpos bivalentes biespecíficos (Roche, documento WO2009/080254), IgG biespecífica (Eli Lilly), Moléculas DuoBody® (Genmab A/S, documento WO 2011/131746), DuetMab (Medimmune, documento US2014/0348839), Biclonics (Merus, documento WO 2013/157953), NovImmune (κλBodies, documento WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, documento WO 2010/151792), (DT)-Ig (GSK/Domantis), Anticuerpo dos en uno o Fabs de doble acción (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, documento WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), cuerpo CovX (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (Medimmune), Dominio Variable Doble DVD-Ig™ (Abbott, US 7.612.18), anticuerpos de doble dominio y doble cabeza (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), Ts2Ab (Medimmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusiones scFv (Genentech/Roche, Novartis, Inmunomedicina, Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246), TvAb (Roche, documentos WO2012025525, WO2012025530), fusiones ScFv/Fc, SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergent), Tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (Fc-DART™) (MacroGenics, documentos WO2008/157379, WO2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diobody (Imclone/Eli Lilly) y mAb entrecruzados químicamente (Karmanos Cancer Center), y mAb fusionados de manera covalente (AIMM therapeutics).

Los ejemplos de moléculas recombinantes de doble direccionamiento similares a IgG, incluyen, pero sin limitación, Ig de doble direccionamiento (DT, *Dual Targeting*) (GSK/Domantis), Anticuerpo dos en uno (Genentech), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, documento WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), estrategias con cadena ligera común (Crucell/Merus, documento US 7262028), κλBodies (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, pero sin limitación, el Dominio Variable Doble (DVD)-Ig™ (Abbott, documento US 7612181), anticuerpos de doble cabeza y doble dominio (Unilever; Sanofi Aventis, documento

W020100226923), anticuerpos biespecíficos de tipo IgG (ImClone/Eli Lilly, Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, documento US 7.951.918), fusión de scFv (Novartis), fusión de scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) y TvAb (Roche, documentos WO2012025525, WO2012025530).

5 Los ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, pero sin limitación, las fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (Fc-DART™) (MacroGenics, documentos WO2008157379 y WO2010080538) y Doble(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China).

10 Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen, aunque sin limitación, F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Fab de acción doble o Bis (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), Fv bivalente biespecífico (Biotecnol) y Fab (UCB-Celltech).

15 Los ejemplos de anticuerpos ScFv, basados en diacuerpos y de dominio incluyen, aunque sin limitación, acoplador específico de linfocitos B (*Bispecific T Cell Engager* (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab™) (Affimed), Tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (DART, *Dual Affinity Retargeting Technology*) (MacroGenics), Diacuerpo monocatenario (Academic), Anticuerpos similares a TCR (AIT, ReceptorLogics), Fusión ScFv de seroalbúmina humana (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanobodies® de doble direccionamiento (Ablynx), anticuerpos de doble direccionamiento de un solo dominio de cadena pesada.

20 Un anticuerpo biespecífico para su uso como CAF de acuerdo con la presente invención puede generarse introduciendo modificaciones en la región constante del anticuerpo.

25 En una realización particular de la divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadena pesada, cada una de la primera y segunda cadena pesada comprende al menos una región de bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en la primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en una cadena pesada de IgG1 humana se ha sustituido, y en la segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en F405, T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana se ha sustituido, y en donde la primera y la segunda cadenas pesadas no están sustituidas en las mismas posiciones.

35 En una realización de la divulgación, en la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana no es K, L o M y opcionalmente el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

40 En una realización de la divulgación, en la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F, R y G, y en la segunda cadena pesada los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionan del grupo que consiste en; T366, L368, K370, D399, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana se han sustituido.

45 En una realización de la divulgación, el aminoácido en posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es otro distinto de K, L o M en la primera cadena pesada, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y opcionalmente el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

50 En una realización de la divulgación, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicha segunda cadena pesada, o viceversa.

55 Por tanto, en una realización de la divulgación, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

60 Salvo que se especifique lo contrario o que el contexto lo contradiga, en el presente documento, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran de acuerdo con el índice de numeración de la UE (descrito en Kabat, 1991). Las expresiones "índice de numeración de la UE" y "numeración de la UE como se expone en Kabat" pueden utilizarse indistintamente y tienen el mismo significado y finalidad. Por tanto, un aminoácido o segmento de una secuencia que "corresponde a" un aminoácido o segmento de otra secuencia es uno que (i) se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa estándar de alineación de secuencias tal como ALIGN, ClustalW o similar, normalmente con los ajustes por defecto y tiene al menos una identidad de secuencia del 50 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o al menos del 95 % con una cadena pesada de IgG1 humana. Es bien conocido en la técnica cómo alinear una secuencia o segmento en una secuencia y de este modo determinar la posición correspondiente en una secuencia en una posición de aminoácido de acuerdo con la presente invención.

El término "aminoácido correspondiente a la posición" como se utiliza en el presente documento, a se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana.

- 5 El término "aminoácido" y la expresión "resto de aminoácido" pueden utilizarse indistintamente y no deben entenderse como limitativos.

En el contexto de la presente invención, el aminoácido puede estar definido por aminoácidos conservativos o no conservativos, y por lo tanto puede clasificarse en consecuencia. Los restos de aminoácidos también pueden dividirse en clases definidas por propiedades físicas y funcionales alternativas. Por tanto, las clases de aminoácidos pueden reflejarse en una o en las dos de las siguientes listas:

- 10

Resto de aminoácido de clase conservativa:

Restos ácidos:	D y E
Restos básicos:	K, R y H
Restos hidrófilos sin carga:	S, T, N y Q.
Restos alifáticos sin carga:	G, A, V, L e I
Restos no polares sin carga:	C, M y P
Restos aromáticos:	F, Y y W

- 15 Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de restos de aminoácidos

Restos que contienen grupos alcohol:	S y T
Restos alifáticos:	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno:	F, H, W e Y
Restos hidrófobos:	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos cargados negativamente:	D y E
Restos polares:	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente:	H, K y R
Restos pequeños:	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños:	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros:	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles:	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como: Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;

- 20 Haciendo referencia a la nomenclatura bien reconocida de los aminoácidos, se utiliza el código de tres letras, o el código de una letra, incluyendo los códigos "Xaa" o "X" para indicar cualquier resto de aminoácido. Por tanto, Xaa o X puede representar normalmente cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. La expresión "de origen natural" como se utiliza en el presente documento se refiere a uno cualquiera de los siguientes restos de aminoácidos; glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, prolina, triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y cisteína. En consecuencia, la anotación "K409R" o "Lys409Arg" significa, que el anticuerpo comprende una sustitución de Lisina por Arginina en la posición 409 del aminoácido.
- 25

- 30 La sustitución de un aminoácido en una posición determinada por cualquier otro aminoácido se denomina: Aminoácido original - posición; o, p. ej., "K409"

Para una modificación en la que el (los) aminoácido(s) original(es) y/o el (los) aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, los más de un aminoácido pueden estar separados por o Por ejemplo, la sustitución de Lisina por Arginina, Alanina o Fenilalanina en la posición 409 es:

- 35 "Lys409Arg,Ala,Phe" o "Lys409Arg/Ala/Phe" o "K409R,A,F" o "K409R/A/F" o "K409 a R", A o F".

Dicha designación puede utilizarse indistintamente en el contexto de la invención, pero tiene el mismo significado y finalidad.

- 40 Por otro lado, la expresión "una sustitución" abarca una sustitución en uno cualquiera o en los otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido K en la posición 409 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P y 409Y. Esto es, por cierto, equivalente a la designación 409X, en donde la X designa cualquier aminoácido distinto del aminoácido original. Estas sustituciones también pueden designarse K409A, K409C, etc. o K409A,C, etc. o K409A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones mencionadas en el presente documento, para incluir específicamente
- 45

en el presente documento cualquiera de dichas sustituciones.

El anticuerpo de acuerdo con la invención también puede comprender una delección de un resto de aminoácido. Dicha delección puede indicarse como "del", e incluye, p. ej., la escritura como K409del. Por tanto, en dichas realizaciones, la Lisina en posición 409 se ha delecionado de la secuencia de aminoácidos.

En una realización de la divulgación, tanto la primera como la segunda región de unión del anticuerpo biespecífico se unen a AXL. Sin embargo, la primera región de unión comprende un conjunto diferente de secuencias CDR de la segunda región de unión. Por tanto, en una realización particular de la divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda región de unión, y una primera y una segunda cadena pesada, en donde cada una de la primera y segunda regiones de unión comprende una región VH y VL seleccionada del grupo que consiste en;

- a) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**;
- (b) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente, y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente **[733]**;
- c) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente, **[140]**;
- d) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 55, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente. **[154]**;
- e) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente. **[154-M103L]**;
- f) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente, **[171]**;
- g) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 65, GAS y 66, respectivamente, **[172]**;
- h) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 70, GAS y 71, respectivamente, **[181]**;
- i) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;
- j) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;
- k) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38,

- [illegible]

- [illegible]

ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;

- [illegible]

SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;

uu) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 94, 95 y 95, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;

vv) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;

ww) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**;

xx) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726]**; y

yy) una primera región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente; y una primera región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente, **[733]**; y una segunda región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una segunda región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;

Los anticuerpos conjugados con un agente citotóxico, un fármaco o similar, también se conocen como conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF). Un CAF puede tener una semivida de períodos de tiempo que son suficientes para que el conjugado de anticuerpo y fármaco se internalice, se degrade e induzca la muerte celular por la toxina liberada.

Por tanto, un CAF puede comprender un anticuerpo contra AXL o un anticuerpo biespecífico y un residuo terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterápico o similar. El agente citotóxico, fármaco quimioterápico o similar puede conjugarse con el anticuerpo o con el anticuerpo biespecífico mediante un enlazador.

Los CAF a menudo se diseñan de tal manera que la carga útil citotóxica esté inactiva cuando se conjuga con el anticuerpo. La carga citotóxica puede liberarse intracelularmente tras la internalización del CAF después de unirse a la membrana plasmática de las células o, como alternativa, en respuesta a la actividad proteolítica en el microentorno tumoral. El término "internalizado" o "internalización" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso biológico en el que moléculas tales como el CAF-AXL son engullidas por la membrana celular y atraídas hacia el interior de la célula. Esto también recibe el nombre de "endocitosis".

En consecuencia, en algunos casos puede ser deseable el uso de anticuerpos que se someten a internalización. Dichos anticuerpos que tienen buenas propiedades de internalización pueden ser adecuados para la conjugación con un agente citotóxico, fármaco o similar, opcionalmente a través de un enlazador, que está diseñado para escindirse intracelularmente.

Una vez internalizado, el CAF puede suministrarse a los lisosomas en la mayoría de los casos, donde la liberación eficaz del fármaco aprovecha el entorno catabólico que se encuentra en estos orgánulos. Normalmente es un enlazador que conecta el anticuerpo con un agente citotóxico. Por tanto, se han diseñado enlazadores especializados para escindirse únicamente en un microentorno específico que se encuentra dentro de o sobre la célula tumoral diana o en el microentorno tumoral. Los ejemplos incluyen enlazadores que se escinden en condiciones ácidas, en condiciones reductoras o con proteasas específicas.

La estabilidad del anticuerpo-enlazador-fármaco en la circulación es importante porque esto permite el suministro del fármaco mediado por anticuerpos a células diana específicas. Además, la larga semivida circulante del CAF proporciona una exposición durante varios días o semanas después de la inyección. Los fármacos que se conjugan a través de enlazadores no escindibles y enlazadores escindibles por proteasa son generalmente más estables en

circulación que los enlazadores disulfuro e hidrazona, aunque la estabilidad de estos dos últimos enlazadores puede ajustarse alterando la estructura química adyacente (Alley *et al.*, 2010).

En una realización, el residuo terapéutico es un agente citotóxico. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (p. ej., que produce su muerte). Los agentes citotóxicos adecuados para formar los CAF para su uso en la presente invención incluyen taxol, tubulinas, duostatinas, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, maitansina o un análogo o derivado de la misma, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina; calicheamicina o análogos o derivados de la misma; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbacina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tal como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (también conocido como raquelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), dolastatina, auristatina, pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PDB), indolinobenzodiazepina (IGN) o análogos de la misma, antibióticos (tales como dactinomicina (antes actinomicina)), bleomicina, daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), agentes antimitóticos (por ejemplo, agentes dirigidos a la tubulina), tales como toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como la cadena A diftérica y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas); toxina de ricina (como la ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina colérica, una toxina similar a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertúsica, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de la soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas son los péptidos antimicrobianos/lífticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18; ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmín, toxina diftérica y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan *et al.*, Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos que pueden administrarse junto con anticuerpos contra AXL o conjugados de anticuerpo y fármaco para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe en cualquier parte del presente documento, tales como, p. ej., citocinas o quimiocinas antineoplásicas, son también candidatos a residuos terapéuticos útiles para la conjugación con un anticuerpo para su uso de acuerdo con la presente invención.

La expresión "agente citotóxico" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier agente que es perjudicial para las células (p. ej., que produce su muerte). Para una descripción de estas clases de fármacos muy conocidas en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase Gross *et al.* (1990). Se proporcionan técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpo, por ejemplo, en Vitetta *et al.* (1993) y en el documento US 5,194,594.

En una realización de la divulgación, el agente citotóxico está enlazado a dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, con un enlazador escindible, tal como *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio)-pentanoato (SSP), maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobenciloxycarbonilo (mc-vc-PAB) o AV-1 K-lock valina-citrulina.

La expresión "enlazador escindible" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un subconjunto de enlazadores catalizados por proteasas específicas en la célula diana o en el microentorno tumoral, dando como resultado la liberación del agente citotóxico. Los ejemplos de enlazadores escindibles son enlazadores basados en motivos químicos que incluyen disulfuros, hidrazonas o péptidos. Otro subconjunto de enlazadores escindibles, añade un motivo enlazador adicional entre el agente citotóxico y el enlazador primario, es decir, el sitio que une la combinación enlazador-fármaco al anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación, el motivo enlazador adicional es escindible por un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, p. ej., un enlazador de peptidilo que es escindible con una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo aunque sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones de la divulgación, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas ellas conocidas por hidrolizar derivados de fármacos de tipo dipéptido dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En una realización específica, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, p. ej., el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Val-Cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa normalmente cuando se conjuga y que las estabilidades de los conjugados en suero son normalmente altas.

En otra realización de la divulgación, el agente citotóxico está enlazado a dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, con un enlazador no escindible, tal como succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (MCC) o maleimidocaproilo (MC).

La expresión "enlazador no escindible" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un subconjunto de enlazadores que, a diferencia de los enlazadores escindibles, no comprenden motivos que sean reconocidos específica y predeciblemente por proteasas intracelulares o extracelulares. Por tanto, los CAF basados en enlazadores no escindibles no se liberan ni se escinden del anticuerpo hasta que el complejo anticuerpo-enlazador-fármaco completo se degrada en el compartimento lisosómico. Los tioéteres son un ejemplo de un enlazador no escindible. En otra realización más, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo (véase el documento US 2005/0238649). Normalmente, dicho enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se utiliza en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular" en el contexto de un enlazador significa que no más del 20 %, normalmente no más del 15 %, más normalmente no más del 10 % e incluso más normalmente no más del 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores, en una muestra del compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco, se escinde cuando el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco está presente en un entorno extracelular (p. ej., plasma). Que un enlazador no sea sustancialmente sensible al entorno extracelular puede determinarse, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado (p. ej., 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y cuantificando después la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En una realización de la divulgación, el agente citotóxico se selecciona del grupo: agentes dirigidos al ADN, p. ej., alquilantes y reticulantes de ADN, tales como calicheamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepinas (PBD) e indolinobenzodiazepina (IGN); agentes dirigidos a microtúbulos, tal como duostatina, tales como duostatina-3, auristatina, tales como monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF), dolastatina, maitansina, *N*-(2')-desacetil-*N*-(2')-(3-marcapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) y tubulicina; y análogos de nucleósidos; o un análogo, derivados o profármacos de los mismos.

En una realización, el CAF-AXL comprende una combinación de;

- i) un enlazador escindible y un agente citotóxico que tiene capacidad de destrucción por vecindad;
- ii) un enlazador escindible y un agente citotóxico que no tiene capacidad de destrucción por vecindad;
- iii) un enlazador no escindible y un agente citotóxico que tiene capacidad de destrucción por vecindad; o
- iv) un enlazador no escindible y un agente citotóxico que no tiene capacidad de destrucción por vecindad.

La expresión "efecto de destrucción por vecindad", "destrucción por vecindad", "capacidad de destrucción por vecindad" o "citotoxicidad por vecindad" como se utiliza en el presente documento, se refiere al efecto donde el agente citotóxico que se conjuga con el anticuerpo mediante un enlazador escindible o no escindible tiene la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares después de la liberación del anticuerpo y, por lo tanto, provocar la destrucción de las células vecinas. Cuando el agente citotóxico está conjugado mediante un enlazador escindible o no escindible, puede ser el agente citotóxico únicamente o el agente citotóxico con una parte del enlazador que tiene la capacidad de destrucción por vecindad. La capacidad de difundirse a través de las membranas celulares está relacionada con la hidrofobicidad del agente citotóxico o la combinación del agente citotóxico y el enlazador. Dichos agentes citotóxicos pueden ser ventajosamente toxinas permeables a la membrana, tal como MMAE que se ha liberado del anticuerpo por proteasas. Especialmente en tumores con expresión diana heterogénea y en tumores sólidos donde la entrada de anticuerpos puede estar limitada, puede ser deseable un efecto de destrucción por vecindad.

La expresión "sin capacidad de destrucción por vecindad", "sin efecto de destrucción por vecindad", "sin destrucción por vecindad" o "sin citotoxicidad por vecindad" como se utiliza en el presente documento, se refiere al efecto en donde el agente citotóxico que se conjuga con el anticuerpo mediante un enlazador escindible o no escindible no tiene la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares después de la liberación del anticuerpo. Por tanto, dichos agentes citotóxicos o combinaciones del agente citotóxico con el enlazador, no serán capaces de destruir las células vecinas después de la liberación del anticuerpo. Se cree sin desear quedar ligado a teoría alguna, que dichas combinaciones de un agente citotóxico y un enlazador escindible o no escindible solo destruirán las células que expresan la diana a la que se une el anticuerpo.

Un enlace estable entre el anticuerpo y el agente citotóxico es un factor importante de un CAF. Se ha demostrado que los tipos de enlazadores tanto escindibles como los no escindibles son seguros en ensayos clínicos y preclínicos.

En una realización de la divulgación, el agente citotóxico se elige del grupo de agentes dirigidos a microtúbulos, tales como auristatinas y maitansinoides.

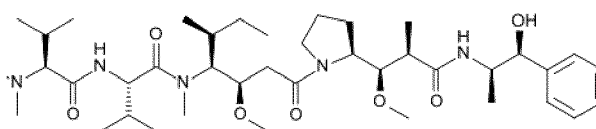
La expresión "agente dirigido a microtúbulos" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un agente o fármaco que inhibe la mitosis (división celular). Los microtúbulos son estructuras esenciales para la separación adecuada del ADN durante la división celular, y la función de los microtúbulos depende fundamentalmente de la "inestabilidad dinámica", es decir, el proceso en el cual las estructuras de microtúbulos se alargan y se acortan continuamente. Los agentes dirigidos a los microtúbulos interrumpen o estabilizan los microtúbulos, lo que impide la formación del huso mitótico, dando como resultado la detención mitótica y la apoptosis. Los agentes dirigidos a microtúbulos pueden derivar, por ejemplo, de sustancias naturales tales como alcaloides vegetales e impiden que las células experimenten mitosis interrumpiendo o estabilizando la polimerización de los microtúbulos, impidiendo de esta

manera la formación del huso mitótico y la posterior división celular, dando como resultado la inhibición del crecimiento canceroso. Son ejemplos de agentes dirigidos a microtúbulos paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, duostatina, auristatina, maitansanoides, tubulinas y dolastatina.

- 5 En una realización de la divulgación, el agente citotóxico son las auristatinas o análogos y derivados del péptido de auristatina (documentos US 5.635.483 y US 5.780.588). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren en la dinámica de los microtúbulos, en la hidrólisis de GTP y en la división nuclear y celular (Woyke *et al.*, 2001) y que tienen actividad contra el cáncer (documento US 5.663.149) y antifúngica (Pettit, 1998). El residuo farmacológico de auristatina puede estar conectado al anticuerpo a través de un enlazador, a través del extremo N (amino) o C (carboxilo) del residuo farmacológico del péptido.

Las realizaciones ilustrativas de auristatina incluyen los residuos farmacológicos de monometil auristatina D_E y D_F ligados al extremo N, divulgados en Senter *et al.* (2004) y descritos en el documento US 2005/0238649.

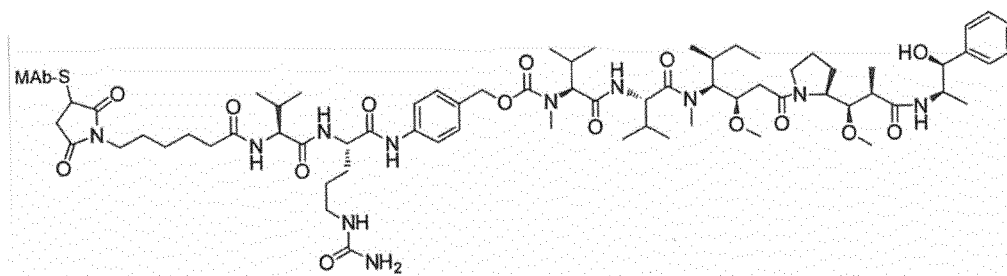
- 15 En una realización particular de la divulgación, el agente citotóxico es monometil auristatina E (MMAE);



- 20 en donde el anticuerpo está enlazado a MMAE en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura química anterior a través del enlazador apropiado.

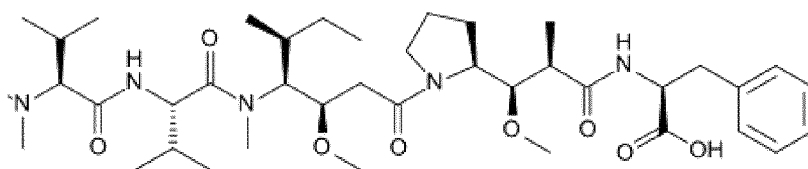
En una realización de la divulgación, el agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) está enlazado al anticuerpo a través de un enlazador de valina-citrulina (VC).

- 25 En otra realización de la divulgación, el agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE) está enlazado al anticuerpo a través de un enlazador de valina-citrulina (VC) y el enlazador de maleimidocaproilo (MC), en donde la combinación del agente citotóxico y los enlazadores tiene la estructura química;



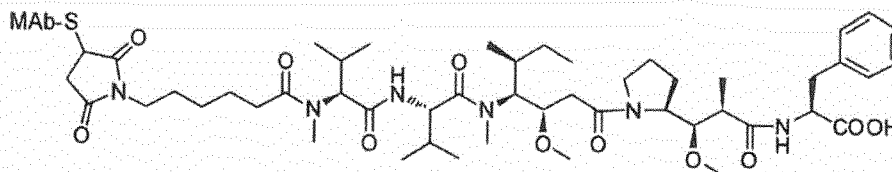
- 30 en donde MAb es el anticuerpo.

En una realización de la divulgación, el agente citotóxico es monometil auristatina F (MMAF);



- 35 en donde el anticuerpo está enlazado a MMAF en el nitrógeno (N) en el lado izquierdo de la estructura química anterior a través del enlazador apropiado.

- 40 En una realización de la divulgación, el agente citotóxico monometil auristatina F (MMAF) está enlazado al anticuerpo mediante un enlazador de maleimidocaproilo (mc), en donde la combinación del agente citotóxico y el enlazador tiene la estructura química;



en donde MAb es el anticuerpo.

- 5 En una realización de la divulgación, el agente citotóxico es la duostatina3.

En otra realización particular de la divulgación, el agente citotóxico es un agente dirigido al ADN.

- 10 La expresión "agente dirigido al ADN" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una clase específica de agentes citotóxicos que pueden alquilar y/o reticular el ADN. Un ejemplo de dicho agente que actúa sobre el ADN son los agentes IGN que comprenden dímeros de indolinobenzodiazepina y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas (PBD), que son muy potentes en cuanto a su capacidad para alquilar y reticular el ADN. Otro ejemplo son los agentes IGN que comprenden monómeros de indolinobenzodiazepina que son muy potentes en cuanto a su capacidad de alquilar solo el ADN. Las duocarmicinas son otra clase de agentes que actúan sobre el ADN. Las duocarmicinas son agentes alquilantes sintéticos, de molécula pequeña, que se unen al surco menor del ADN. Estos compuestos son adecuados para dirigirse a tumores sólidos así como a tumores hemáticos.

- 20 En una realización de la divulgación, el CAF-AXL comprende de dos a cuatro moléculas citotóxicas por anticuerpo. Dependiendo de las propiedades químicas de la toxina y de la combinación enlazador-toxina, de dos a cuatro moléculas citotóxicas por anticuerpo puede ser superior a los conjugados con mayor carga que se eliminan más rápidamente de la circulación que los conjugados con menor carga. La carga del agente citotóxico se representa como p y es el número promedio de residuos de agente citotóxico por anticuerpo en una molécula (también denominado relación fármaco-anticuerpo, DAR (*drug to antibody ratio*)). La carga del agente citotóxico puede variar de 1 a 20 residuos farmacológicos por anticuerpo y puede producirse en aminoácidos con grupos funcionales útiles tales como, aunque no de forma limitativa, grupos amino o sulfhidrilo, como en la lisina o la cisteína.

En una realización de la divulgación, el número de agentes citotóxicos por anticuerpo es de 1 a 8, tal como de 2 a 7, tal como de 2 a 6, tal como de 2 a 5, tal como de 2 a 4 y tal como de 2 a 3.

- 30 En otra realización de la divulgación, el CAF-AXL comprende de cuatro a ocho moléculas citotóxicas por anticuerpo. En otra realización de la divulgación, el CAF-AXL comprende de seis a diez moléculas citotóxicas por anticuerpo. En otra realización más de la divulgación, el CAF-AXL comprende de 10 a 30, tal como de 15 a 25, tal como 20, moléculas citotóxicas por anticuerpo.

- 35 Dependiendo de la forma de conjugación, la carga p puede estar limitada por el número de sitios de conexión con el anticuerpo, por ejemplo, cuando la conexión es un grupo tiol de cisteína o una lisina. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan estar ligados a un residuo farmacológico ya que la mayoría de los residuos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro. Por lo tanto, en aquellas realizaciones de la divulgación, donde el agente citotóxico se conjuga a través de un tiol de cisteína, el anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones parcial o totalmente reductoras, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones de la divulgación, la carga de fármaco de un CAF de la invención varía de 1 a aproximadamente 8, ya que un máximo de 8 grupos tiol de cisteína libres quedan disponibles después de la reducción (parcial) del anticuerpo (hay 8 cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro intercadena).

- 45 En una realización de la divulgación, el residuo enlazador farmacológico es vcMMAE. El residuo enlazador farmacológico vcMMAE y métodos de conjugación se divulgan en los documentos WO 2004/010957; US 7.659.241; US 7.829.531; y US 7.851.437 (Seattle Genetics). vcMMAE se forma a través de la conjugación del enlazador mc-vc-PAB y el residuo citotóxico MMAE, y el residuo enlazador farmacológico vcMMAE se une a los anticuerpos contra AXL en los restos de cisteína usando un método similar a los divulgados en estos documentos, p. ej., como se describe en el Ejemplo 8.

- 55 En una realización de la divulgación, el residuo enlazador farmacológico es mcMMAF. El residuo enlazador farmacológico mcMMAF y métodos de conjugación se divulgan en los documentos US 7.498.298; US 7.994.135 y WO 2005/081711 (Seattle Genetics), y el residuo enlazador farmacológico mcMMAF se une a los anticuerpos contra AXL en los restos de cisteína usando un método similar a los divulgados en estos documentos.

En una realización de la divulgación, el agente citotóxico está enlazado a 1 o 2 lisinas dentro de la secuencia de

aminoácidos del anticuerpo mediante conjugación K-Lock™ como se describe en los documentos WO 2013/173391, WO 2013/173392 y WO 2013/173393 (Concortis Biosystems). La duostatina3 (también conocida como Duo3) también puede unirse a los anticuerpos contra AXL en los restos de lisina usando un método similar a los descritos en estos documentos.

5 En los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL de la invención, pueden usarse otras tecnologías con enlazadores, tales como enlazadores que comprenden un grupo hidroxilo.

10 En una realización de la divulgación, el enlazador se conecta a restos de cisteína libres del anticuerpo contra AXL obtenidos mediante reducción (parcial) del anticuerpo contra AXL.

En una realización particular, el enlazador es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE; En una realización de la divulgación el enlazador SSP y el agente citotóxico es DM1.

15 En una realización particular de la divulgación, el enlazador es MMC y el agente citotóxico es DM1; o el enlazador es MC y el agente citotóxico es MMAF.

20 En una realización particular de la divulgación, el enlazador es el enlazador escindible AV1-K lock y el agente citotóxico es duostatina3.

En una realización de la divulgación, el CAF-AXL comprende el enlazador mc-vc-PAB, el agente citotóxico MMAE y un anticuerpo en donde al menos una región de unión comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en;

25 En una realización, el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, **[107]**;
- (b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148]**;
- (c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente **[733]**;
- (d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154]**;
- (e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente **[154-M103L]**;
- (f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente, **[171]**;
- (g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 65, GAS y 66, respectivamente, **[172]**;
- (h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 70, GAS y 71, respectivamente, **[181]**;
- (i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183]**;
- (j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente, **[183-N52Q]**;
- (k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 81, AAS y 82, respectivamente, **[187]**;
- (l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente, **[608-01]**;
- (m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente, **[610-01]**;

- (n) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente, **[613]**;
- 5 (o) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente, **[613-08]**;
- (p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente, **[620-06]**;
- 10 (q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726]**;
- (r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente, **[726-M101L]**;
- 15 (s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente, **[140]**;
- (t) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente, **[613 / 613-08]**;
- 20 (u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente, **[148 / 140]**;
- 25 (v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente **[171 / 172 / 181]**; y
- (w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente **[726 / 187]**; y
- 30 (x) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente **[613 / 608-01 / 610-01 / 620-06]**.
- 35 En otra realización alternativa de la divulgación, un conjugado de anticuerpo y fármaco contra AXL comprende un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácido nucleico. En una realización similar, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (p. ej., una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunoestimulador (p. ej., una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunoestimulador).
- 40 En otra realización alternativa de la divulgación, un anticuerpo contra AXL se conjuga con un aptámero o con una ribozima o con un análogo peptídico funcional o con derivado de los mismos.
- 45 En otra realización alternativa de la divulgación, se proporcionan conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo contra AXL radiomarcado puede utilizarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Como ejemplos no limitativos de marcadores de polipéptidos se incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re . En la técnica se conocen métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados (véase, por ejemplo, Junghans *et al.* (1996); US 4.681.581; US 4.735.210; US 5.101.827; US 5.102.990; US 5.648.471; y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo de halógeno puede conjugarse a través del método de la cloramina-T.
- 50 En una realización de la divulgación, el anticuerpo se conjuga con un radioisótopo o con un quelato que contenga un radioisótopo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un enlazador quelante, p. ej., DOTA, DTPA o tiuxetán, que permite crear un complejo entre el anticuerpo y un radioisótopo. El anticuerpo también puede, o como alternativa, comprender o conjugarse con uno o más aminoácidos radiomarcados u otras moléculas radiomarcadas. Un anticuerpo contra AXL radiomarcado puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Como ejemplos no limitativos de radioisótopos se incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bs , ^{225}Ac y ^{227}Th .
- 55 Los anticuerpos contra AXL también pueden estar químicamente modificados por conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Ejemplos de polímeros y métodos ilustrativos para unirlos a péptidos, se ilustran, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106; US 4.179.337; US 4495285 y US 4609546. Como polímeros adicionales se incluyen polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 20.000). Esto puede usarse, por ejemplo, si el anticuerpo contra AXL es un fragmento.
- 60
- 65

Cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo contra AXL con la molécula o moléculas conjugadas, tales como los descritos anteriormente, pueden emplearse, incluidos los métodos descritos en Hunter *et al.* (1974), Pain *et al.* (1981) y Nygren (1982). Dichos anticuerpos pueden producirse conjugando químicamente el otro residuo con el lado aminoterminal o el lado carboxiterminal del anticuerpo contra AXL (p. ej., una cadena H o L del anticuerpo contra AXL) (véase, p. ej., Kanemitsu, 1994). Dichos derivados de anticuerpos conjugados también pueden generarse por conjugación en restos o azúcares o aminoácidos no naturales o aminoácidos adicionales internos que se han introducido en el dominio constante del anticuerpo, cuando corresponda.

Los agentes pueden acoplarse directa o indirectamente a un anticuerpo contra AXL. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento a través de un residuo espaciador a restos de cisteína o lisina en el anticuerpo biespecífico. En una realización de la divulgación, un anticuerpo contra AXL se conjuga, mediante un espaciador o enlazador, a una molécula de profármaco que puede activarse *in vivo* a un fármaco terapéutico. Después de la administración, los espaciadores o enlazadores son escindidos por enzimas asociadas a células tumorales u otras condiciones específicas del tumor, mediante lo cual se forma el fármaco activo. En los documentos WO 2002/083180, WO 2004/043493, WO 2007/018431, WO 2007/089149, WO 2009/017394 y WO 2010/62171 (Syngenta BV), se describen ejemplos de dichas tecnologías con profármacos y enlazadores. En el documento US 6.989.452 (Medarex) también puede encontrarse una tecnología de anticuerpo y profármaco adecuada y análogos de duocarmicina.

En una realización de la divulgación, el anticuerpo contra AXL se conecta a un enlazador quelante, p. ej., tiuxetán, lo que permite conjugar el anticuerpo con un radioisótopo.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un CAF que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana, para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con un inhibidor de BRAF, un inhibidor de MEK o una combinación de un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK, en donde el CAF comprende un anticuerpo que comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, 40 y 41, respectivamente, [107], enlazado a MMAE a través de un enlazador mc-vc-PAB, y el CAF-AXL y el al menos un inhibidor se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial.

En una realización de la divulgación, la al menos una región de unión comprende una región VH que comprende la SEQ ID NO:1 y una región VL comprende la SEQ ID NO:2. Opcionalmente, el isotipo del anticuerpo es IgG1, p. ej., alotipo IgG1m(f). El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal de longitud completa, tal como un anticuerpo monoclonal IgG1,k de longitud completa.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF se selecciona del grupo que consiste en vemurafenib, dabrafenib, encorafenib y sorafenib, y el melanoma presenta una mutación en un resto de BRAF seleccionado de V600, L597 y K601, tal como una mutación en BRAF seleccionada de V600E, V600K, V600D, L597R y K601E. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es vemurafenib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es dabrafenib. En una realización, el inhibidor de BRAF es encorafenib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es sorafenib.

En una realización de la divulgación, el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK se selecciona del grupo que consiste en trametinib, cobimetinib, binimetinib y selumetinib. En una realización, el inhibidor de MEK es trametinib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es cobimetinib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es binimetinib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de MEK es selumetinib.

En una realización, el CAF-AXL se usa junto con un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK seleccionados de (a) a (p):

- (a) vemurafenib y trametinib;
- (b) vemurafenib y cobimetinib;
- (c) vemurafenib y binimetinib;
- (d) vemurafenib y selumetinib;
- (e) dabrafenib y trametinib;
- (f) dabrafenib y cobimetinib;
- (g) dabrafenib y binimetinib;
- (h) dabrafenib y selumetinib;
- (i) encorafenib y trametinib;
- (j) encorafenib y cobimetinib;
- (k) encorafenib y binimetinib;

- (l) encorafenib y selumetinib;
- (m) sorafenib y trametinib
- (n) sorafenib y cobimetinib;
- (o) sorafenib y binimetinib; y
- (p) sorafenib y selumetinib.

Composiciones y kits

El CAF-AXL para su uso de acuerdo con la presente invención, puede administrarse en forma de una composición.

En una realización de la divulgación, el CAF-AXL o la composición farmacéutica que comprende el CAF-AXL, es para su uso en el tratamiento de un melanoma junto con al menos un inhibidor de la vía MAPK, p. ej., al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa, de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior. Normalmente, el CAF-AXL y el inhibidor de la combinación se administran por separado y se formulan como composiciones farmacéuticas distintas.

En una realización de la divulgación, sin embargo, la composición farmacéutica que comprende el CAF-AXL comprende además el al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa con el que se está tratando o se ha tratado la neoplasia, p. ej., un inhibidor de BRAF, inhibidor de MEK o combinaciones de los mismos. Los CAF-AXL para su uso de acuerdo con la presente invención junto con el al menos un inhibidor de serina/treonina cinasa, pueden proporcionarse también en forma de kit, para la administración simultánea, por separado o secuencial, en donde el kit puede comprender además instrucciones de uso.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de serina/treonina cinasa de la combinación, composición o kit, se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, PLX4720, trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, VTX11E y LTT-4620.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF en la combinación, composición o kit, es vemurafenib o un análogo o derivado del mismo terapéuticamente eficaz, tal como el dabrafenib, encorafenib, sorafenib o PLX4720. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es vemurafenib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es dabrafenib. En una realización, el inhibidor de BRAF es encorafenib. En una realización de la divulgación, el inhibidor de BRAF es sorafenib.

En una realización de la divulgación, el inhibidor de serina/treonina cinasa de la combinación, la composición o el kit, comprende al menos un inhibidor de BRAF y al menos un inhibidor de MEK, en donde al menos un inhibidor de BRAF se selecciona de vemurafenib, dabrafenib y una combinación de los mismos, y en donde el inhibidor de MEK se selecciona de selumetinib (AZD6244) y trametinib, y una combinación de los mismos. Por ejemplo, la combinación, la composición o el kit, pueden comprender dabrafenib y trametinib; vemurafenib y trametinib; dabrafenib, vemurafenib y trametinib; dabrafenib y selumetinib; o vemurafenib y selumetinib. Como alternativa, la combinación, la composición o el kit, pueden comprender

- (a) vemurafenib y trametinib;
- (b) vemurafenib y cobimetinib;
- (c) vemurafenib y binimetinib;
- (d) vemurafenib y selumetinib;
- (e) dabrafenib y trametinib;
- (f) dabrafenib y cobimetinib;
- (g) dabrafenib y binimetinib;
- (h) dabrafenib y selumetinib;
- (i) encorafenib y trametinib;
- (j) encorafenib y cobimetinib;
- (k) encorafenib y binimetinib;
- (l) encorafenib y selumetinib;
- (m) sorafenib y trametinib
- (n) sorafenib y cobimetinib;
- (o) sorafenib y binimetinib; o
- (p) sorafenib y selumetinib.

Los kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de diversos componentes de kits farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como resultará fácilmente evidente para un experto en la materia. En el kit también pueden incluirse instrucciones impresas, ya sea en forma de prospecto o etiqueta, que indiquen las cantidades de los componentes a administrar, las pautas de administración y/o las pautas de mezcla de los componentes.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables,

así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos, de acuerdo con técnicas convencionales como las divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995).

Los transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos, deben ser adecuados para el CAF-AXL y el modo de administración elegido. La idoneidad de los transportadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la ausencia de impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegidos (p. ej., menos de un impacto sustancial (inhibición relativa del 10 % o menor, inhibición relativa del 5 % o menor, etc.) al unirse al antígeno).

Una composición farmacéutica también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos exentos de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden modificarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En la técnica se conocen bien cuáles son las vías de administración adecuadas de un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* y los expertos en la materia pueden seleccionarlos.

En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado(a) por vía parenteral", como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracárdica, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

En una realización de la divulgación, la composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Como transportadores farmacéuticamente aceptables se incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles con un CAF-AXL o agente terapéutico para su uso de acuerdo con la presente invención.

Como ejemplos de transportadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas se incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o diferentes tampones. En la técnica farmacéutica se conocen otros transportadores.

Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica se conoce bien el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas.

Puede conservarse una fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando materiales de recubrimiento, tal como lecitina, conservando el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y utilizando tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfato de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA),

sorbitol, ácido tartárico, ácido fosforoso y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio, en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los CAF-AXL o agentes terapéuticos para los usos de la presente invención, pueden prepararse con transportadores que protejan el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos transportadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poli-ortoésteres, y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Generalmente, los expertos en la materia conocen métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, p. ej., Robinbson: Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978).

En una realización de la divulgación, los compuestos pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Los transportadores farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica se conoce bien el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones otros compuestos activos o terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas para inyección normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y conservación. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El transportador puede ser un disolvente o un medio de dispersión acuoso o no acuoso que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como el oleato de etilo. Puede conservarse la fluidez adecuada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, tal como lecitina, conservando el tamaño de partícula necesario en caso de las dispersiones y utilizando tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej., como los enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los restantes ingredientes necesarios, p. ej., de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son ejemplos de métodos de preparación, el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), que proporcionan un polvo del principio activo así como cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los restantes ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son ejemplos de métodos de preparación, el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), que proporcionan un polvo del principio activo así como cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Producción de anticuerpos contra AXL

Los anticuerpos para su uso como CAF de acuerdo con la invención pueden prepararse de manera recombinante en una célula hospedadora, usando construcciones de ácido nucleico, normalmente en forma de uno o más vectores de expresión. En una realización, la construcción de ácido nucleico codifica una o más secuencias expuestas en la Tabla 1. En una realización adicional de la divulgación, el vector de expresión comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo monoclonal de IgG1, k humano.

El anticuerpo contra AXL expresado puede conjugarse posteriormente con un residuo como se describe en el presente documento. En otra realización, el anticuerpo contra AXL puede usarse posteriormente para generar un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento, antes de la conjugación.

El vector de expresión puede ser cualquier vector adecuado, incluidos vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácido nucleico sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Como ejemplos de dichos vectores se incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácido nucleico (ARN o ADN) vírico. En una realización de la divulgación, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo contra AXL está comprendido en un vector de ADN o ARN no marcado, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe por ejemplo en Sykes y Johnson (1997), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe por ejemplo en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño muy pequeño ("*midge*") (como se describe, por ejemplo, en Schakowski *et al.* (2001)), o como una construcción precipitada de vector de ácido nucleico, tal como una construcción precipitada con fosfato cálcico (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147; Benvenisty y Reshef, 1986; Wigler *et al.*, 1978; y Coraro y Pearson, 1981). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización de la divulgación, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo contra AXL en una célula bacteriana. Como ejemplos de dichos vectores se incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, 1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

Un vector de expresión también puede, o como alternativa, ser un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en Ausubel *et al.*, 1987, y Grant *et al.*, 1987).

Una construcción de ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen bien en la técnica e incluyen péptidos líderes de secreción o péptidos señal, secuencias dirigidas a orgánulos (p. ej., secuencias de localización nuclear, señales de retención ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito al cloroplasto), secuencias de localización/anclaje de membranas (p. ej., secuencias de transferencia de parada, secuencias de anclaje de GPI), y similares.

En un vector de expresión, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos contra AXL pueden comprender o estar asociados a cualquier promotor, potenciador y a otros elementos adecuados que faciliten la expresión. Como ejemplos de dichos elementos se incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., el promotor/potenciador IE (inmediato temprano) de CMV humano, así como promotores de RSV, SV40, SL3-3, MMTV y de LTR (repeticiones terminales largas) del VIH), secuencias de terminación de poli (A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en contraposición a un promotor constitutivo, tal como el IE de CMV (el experto reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo contra AXL puede colocarse en, y/o suministrarse a, la célula hospedadora o al animal hospedador a través de un vector vírico.

La célula hospedadora puede ser una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo contra AXL como se define en el presente documento o una molécula biespecífica de la invención como se define en el presente documento. Como ejemplos de células hospedadoras se incluyen células de levadura, de bacterias y de mamíferos, tales como células CHO o HEK o derivadas de las mismas. Por ejemplo, en una realización de la divulgación, la célula comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión del anticuerpo contra AXL. En otra realización de la divulgación, la célula comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión del anticuerpo contra AXL.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula en cuestión particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias medioambientales, es posible que dicha descendencia no sea de hecho idéntica a la célula progenitora, pero aún así se incluye en el ámbito de la expresión "célula hospedadora" como se utiliza en el presente documento. Como células hospedadoras recombinantes se incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, células PER.C6, NS0 y células linfocíticas, y células procariotas tales como *E. coli* y otros hospedadores eucariotas tales como células de plantas y hongos.

El término "transfectoma", como se utiliza en el presente documento, incluye células hospedadoras eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo o un antígeno diana, tales como células CHO, células PER.C6, NS0, células HEK-293, células de plantas u hongos, incluyendo células de levadura.

- 5 Los anticuerpos pueden producirse de manera alternativa a partir un hibridoma preparado a partir de linfocitos B esplénicos de murino obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica una región extracelular de AXL. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o de mamíferos no humanos inmunizados, tales como conejos, ratas, perros, primates, etc.

15 Los anticuerpos humanos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos, p. ej., ratones HuMAb, que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. El ratón HuMAb, contiene un minilocus del gen de inmunoglobulina humano que codifican secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera k no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de la cadena μ y k (Lonberg *et al.*, 1994a). En consecuencia, después de la inmunización, los ratones generan una respuesta contra anticuerpos humanos, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos, experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad IgG, κ (Lonberg *et al.*, 1994b; Lonberg y Huszar, 1995; Harding y Lonberg, 1995). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Tuailon *et al.*, 1994; y Fishwild *et al.*, 1996. Véanse también los documentos US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.789.650; US 5.877.397; US 5.661.016; US 5.814.318; US 5.874.299; US 5.770.429; US 5.545.807; WO 98/024884; WO 94/025585; WO 93/001227; WO 92/022645; WO 92/003918; y WO 01/009187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. Además, pueden generarse anticuerpos humanos a partir de ratones o ratas transgénicos para producir anticuerpos quiméricos de ser humano-rata que pueden usarse como fuente para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales totalmente humanos.

30 Además, los anticuerpos humanos pueden identificarse mediante tecnologías de presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación en retrovirus, presentación en ribosomas, expresión en mamíferos, presentación en levaduras y otras técnicas conocidas en la materia, y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, como tales, dichas técnicas son muy conocidas en la materia.

Tabla 2 - Secuencias

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
1	107 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSY</u> AMN WVRQAPGK GLEWVST <u>SGSGAST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC <u>AKIWI</u> AFDIWGQGTMTVSS	Ab de unión al dominio de Ig1 HCo12-BalbC
2	107 VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIY <u>GASSR</u> ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> YGSSPYTFGQGTKLEIK	
3	140 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSY</u> AMT WVRQAPGK GLEWVSAI <u>ISISGAST</u> FYADSVKGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLR EDTAVYFCRGYSGYVYDAFDIWGQGTMTVSS	
4	140 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKA PKSLIYA <u>AASLQSGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QYNSYPLTFGGGTKVEIK	
5	148 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAAS <u>GFTFSSY</u> AMT WVRQAPGK GLEWVSAI <u>ISISGAST</u> FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR EDTAVYYC <u>RGYSGYVYDAFD</u> FWGQGTMTVSS	Ab de unión al dominio de Ig2 HCo12-BalbC

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
6	148 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS <u>QGISNW</u> LAWYQQKPEKA PKSLIY <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYNSYPLT</u> FGGGTKVEIK	
7	154 VH	EVQLDSSGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYA</u> MSWVRQAPGK GLEWVSA <u>ISIGGGN</u> AYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AADTAVYYC <u>AKPGFIMVRGPLDY</u> WGQGALVTVSS	Ab de unión al dominio de FN1 HCo12- BalbC
8	154-M103L VH	EVQLDSSGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYA</u> MSWVRQAPGK GLEWVSA <u>ISIGGGN</u> AYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AADTAVYYC <u>AKPGFILVRGPLDY</u> WGQGALVTVSS	
9	154 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVNSY</u> LAWYQQKPGQA PRLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>Q</u> <u>QYGSSPYT</u> FGQGKLEIK	
10	171 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYA</u> MSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> SLSYAFDIWGQGMVTVSS	Ab de unión al dominio de Ig2 HCo17- BalbC
11	171 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
12	172 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSNYA</u> MSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> SLSYAFDIWGQGMVTVSS	
13	172 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
14	181 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYA</u> MSWVRQAPGK GLEWVSD <u>ISVGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLR AEDTAVYYC <u>AKEGYIWFGE</u> SLSYAFDIWGQGMVTVSS	
15	181 VH	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSSY</u> LAWYQQKPGQAP RLIY <u>GASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGRSFT</u> FGPGTKVDIK	
16	183 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>INQSGST</u> NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTVTVSS	Ab de unión al dominio de FN1 HCo17- BalbC
17	183-N52Q VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>IQSGST</u> NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTSVYYC <u>ASGNWDHFFDY</u> WGQGLTVTVSS	
18	183 VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQHKPGKA PKLLIY <u>ATSS</u> LQSGVTSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>AKSFPWT</u> FGQGKVEIK	

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
19	187 VH	QVPLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYH WSWIRQPPGK GLEWIGE ISHSGRT NYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYC ASFITMIRGTIITHFDY WGQGLTVTVSS	
20	187 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISSW LAWYQQKPEKA PKSLIY AASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC Q QYHSYPYTF GQGTKLEIK	
21	VH de 608-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAS GGTFSSYA ISWVRQAPGQ GLEWMGR IPIFGIA NYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRA EDTAVYYC CARRGDYYGSGSPDVFDI WGQGTMTVTVSS	
22	VL de 608-01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQ YGSSYTF GQGTKLEIK	
23	VH de 610-01	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAS GGTFSSYA ISWVRQAPGQ GLEWMGR IPIFGIA NYVQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRA EDTAVYYC CARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGTMTVTVSS	
24	VL de 610-01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQ YGSSYTF GQGTKLEIK	
25	613 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAS GGTFSSYA INWVRQAPG QGLEWMGR IPIFGIV NYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC CARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGTMTVTVSS	Ab de unión al dominio de Ig1 HCo20
26	613 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQK PGQAPRLLIY GASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYC COOYGSSYTF GOGTKLEIK	
27	VH de 613-08	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAS GGTFSSYA INWVRQAPG QGLEWMGR IPIFGIV NYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC CARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGTMTVTVSS	
28	VL de 613-08	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPR LLIY DASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPEDFAVYYC QQR SNWLT FGGGTKVEIK	
29	VH de 620-06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAS GGTFSSYA ISWVRQAPGQ GLEWMGR IPIFGIA NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYC CARRGNYYGSGSPDVFDI WGQGTMTVTVSS	
30	VL de 620-06	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKPGQAP RLLIY GASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQ YGSSYTF GQGTKLEIK	
31	726 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAID GGSFSGYY WSWIRQPPGK GLEWIGE ISHSGRT NYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVAAAD TAVYYC ARFITMIRGAIITHFDY WGQGALVTVSS	Ab de unión al dominio de FN2 HCo17- BalbC

ES 3 029 907 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
32	726-M101L VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAID <u>GGSFSGYY</u> WSWIRQPPGK GLEWIGE <u>ISHSGRT</u> NYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVAAAD TAVYYC <u>CARFITLIRGAIITHFDY</u> WGQALVTVSS	
33	726 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS <u>QGISSW</u> LAWYQQKPEKA PKSLIY <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYHSYPYTF</u> GQGTKLEIK	
34	733 VH	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAAS <u>GFSFSTY</u> AMHWVRQAPG KGLEWVAV <u>ISYDGDNK</u> YSADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC <u>ARGRKLGI</u> DAFDI WGQGTMTVTVSS	Ab de unión al dominio de FN1 HCo17- BalbC
35	733 VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS <u>QGISSA</u> LAWYQQKPGKAPK LLIY <u>DASS</u> LESQVPSRFSGSGSGTDFLTITISGLQPEDFATYYC <u>QQF</u> <u>NSYPFT</u> FGPGTKVDIK	
36	CDR1 de VH 107	GFTFSSYA	
37	CDR2 de VH 107	TSGSGAST	
38	CDR3 de VH 107	AKIWIAFDI	
39	CDR1 de VL 107	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 107	GAS	
40	CDR3 de VL 107	QQYGSSPYT	
41	CDR1 de VH 140	GFTFSSYA	
42	CDR2 de VH 140	ISISGAST	
43	CDR3 de VH 140	RGYSGYVYDAFDI	
44	CDR1 de VL 140	QGISNW	
	CDR2 de VL 140	AAS	
45	CDR3 de VL 140	QQYNSYPLT	
46	CDR1 de VH 148	GFTFSSYA	
47	CDR2 de VH 148	ISISGGST	
48	CDR3 de VH 148	RGYSGYVYDAFDF	
49	CDR1 de VL 148	QGISNW	
	CDR2 de VL 148	AAS	
50	CDR3 de VL 148	QQYNSYPLT	
51	CDR1 de VH 154	GFTFSSYA	
52	CDR2 de VH 154	ISIGGGNA	
53	CDR3 de VH 154	AKPGFIMVRGPLDY	
54	CDR3 de VH de 154-M103L	AKPGFILVRGPLDY	
55	CDR1 de VL 154	QSVSNSY	
	CDR2 de VL 154	GAS	
56	CDR3 de VL 154	QQYGSSPYT	
57	CDR1 de VH 171	GFTFSSYA	
58	CDR2 de VH 171	ISVSGGST	
59	CDR3 de VH 171	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
60	CDR1 de VL 171	QSVSSSY	

ES 3 029 907 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
	CDR2 de VL 171	GAS	
61	CDR3 de VL 171	QQYGRSFT	
62	CDR1 de VH 172	GFTFSNYA	
63	CDR2 de VH 172	ISVSGGST	
64	CDR3 de VH 172	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
65	CDR1 de VL 172	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 172	GAS	
66	CDR3 de VL 172	QQYGRSFT	
67	CDR1 de VH 181	GFTFSSYA	
68	CDR2 de VH 181	ISVSGGST	
69	CDR3 de VH 181	AKEGYIWFGESLSYAFDI	
70	CDR1 de VL 181	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 181	GAS	
71	CDR3 de VL 181	QQYGRSFT	
72	CDR1 de VH 183	GGSFSGYY	
73	CDR2 de VH 183	INQSGST	
74	CDR2 de VH de 183-N52Q	IQQSGST	
75	CDR3 de VH 183	ASGNWDHFFDY	
76	CDR1 de VL 183	QGISSW	
	CDR2 de VL 183	ATS	
77	CDR3 de VL 183	QQAISFPWT	
78	CDR1 de VH 187	GGSFSGYH	
79	CDR2 de VH 187	ISHSGRT	
80	CDR3 de VH 187	ASFITMIRGTIITHFDY	
81	CDR1 de VL 187	QGISSW	
	CDR2 de VL 187	AAS	
82	CDR3 de VL 187	QQYHSYPYT	
83	CDR1 de VH 608-01	GGTFSSYA	
84	CDR2 de VH 608-01	IIPIFGIA	
85	CDR3 de VH 608-01	ARRGDYYGSGSPDVFDI	
86	CDR1 de VL 608-01	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 608-01	GAS	
87	CDR3 de VL 608-01	QQYGSSYT	
88	CDR1 de VH 610-01	GGTFSSYA	
89	CDR2 de VH 610-01	IIPIFGIA	
90	CDR3 de VH 610-01	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
91	CDR1 de VL 610-01	QSVSSSY	

ES 3 029 907 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
	CDR2 de VL 610-01	GAS	
92	CDR3 de VL 610-01	QQYGSSYT	
93	CDR1 de VH 613	GGTFSSYA	
94	CDR2 de VH 613	IPIFGIV	
95	CDR3 de VH 613	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
96	CDR1 de VL 613	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 613	GAS	
97	CDR3 de VL 613	QQYGSSYT	
98	CDR1 de VH 613-08	GGTFSSYA	
99	CDR2 de VH 613-08	IPIFGIV	
100	CDR3 de VH 613-08	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
101	CDR1 de VL 613-08	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 613-08	DAS	
102	CDR3 de VL 613-08	QQRSNWLT	
103	CDR1 de VH 620-06	GGTFSSYA	
104	CDR2 de VH 620-06	IPIFGIA	
105	CDR3 de VH 620-06	ARRGNYYGSGSPDVFDI	
106	CDR1 de VL 620-06	QSVSSSY	
	CDR2 de VL 620-06	GAS	
107	CDR3 de VL 620-06	QQYGSSYT	
108	CDR1 de VH 726	GGSFSGYY	
109	CDR2 de VH 726	ISHSGRT	
110	CDR3 de VH 726	ARFITMIRGAIITHFDY	
111	CDR3 de VH de 726-M101L	ARFITLIRGAIITHFDY	
112	CDR1 de VL 726	QGISSW	
	CDR2 de VL 726	AAS	
113	CDR3 de VL 726	QQYHSYPYT	
114	CDR1 de VH 733	GFSFSTYA	
115	CDR2 de VH 733	ISYDGDNK	
116	CDR3 de VH 733	ARGRKLIGIDAFDI	
117	CDR1 de VL 733	QGISSA	
	CDR2 de VL 733	DAS	
118	CDR3 de VL 733	QQFNSYPFT	
119	CDR2 de VH de dominio de Ig2	ISISGXST - en donde X es A o G	

ES 3 029 907 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
120	CDR3 de VH de dominio de Ig2	RGYSGYVYDAFDX - en donde X es I o F	
121	CDR1 de VH de dominio de FN2	GGSFSGYX - en donde X es H o Y	
122	CDR3 de VH de dominio de FN2	AX1FITMIRGX2IITHFDY - en donde X1 es S o R; y X2 es T o A	
123	CDR1 de VH de dominio de FN1	GFTFSXYA - en donde X es S o N	
124	CDR2 de VH de dominio de FN1	ISVSGGST	
125	CDR3 de VH de dominio de FN1	AKEGYIWFGEISLSYAFDI	
126	CDR2 de VH de dominio de Ig1	IIPIFGIX-en donde X es A o V	
127	CDR3 de VH de dominio de Ig1	ARRGXYYGSGSPDVFDI - en donde X es D o N	
128	CDR1 de VL de dominio de Ig1	QSVXSSY - en donde X es S o del	
	CDR2 de VL de dominio de Ig1	XAS - en donde X es D o G	
129	CDR3 de VL de dominio de Ig1	QQX1X2X3X4X5T-en donde X1 es R o Y; X2 es S o G; X3 es N o S; X4 es W o S; y X5 es L o Y	
130	Proteína AXL humana (Swissprot P30530)	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLL WLQDAVPLATAPGHGHPQRS LHVPGLNKTSSFCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVA VKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSER ESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMA DIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIY NGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMW EATRGTQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSR CWELNPQDRPSFTELREDLTKALPPAQEPDEILYVNMDEGG GYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSCLTAAEVHPAGRYVLC PST TPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
131	AXL de <i>Mus musculus</i>	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQ TEAGSPFVG NPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQ	

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
		<p>QILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQLRISALQLSDAGEYQ CMVHLEGRTFVSQPGFVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSC QAQGPPEPVTLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPGLNKTSSFS CEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPG LSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPH QLRLEKLLPHTPYHIRISCSSSQGPSWTHWLPVETTEGVPLGPP ENVSAMRNGSQVLVRWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEV LMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWVSLPVPL EPWRPGQGQPLHHLVSEPPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACV LILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTE ATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQ LNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVM RLIGVCFQGSRERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYL PTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSV CVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSD VWSFGVTMWEIATRGTTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADC LDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEI LYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSCLTAAEVH PAGRYVLCPTTSPAPQPADRGSPAAPGQEDGA</p>	
132	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio Ig1 de <i>Mus musculus</i>	<p>MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV LELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG VTMWEIATRGTTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEIYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSCLTAAEVHPAGR YVLCPTTSPAPQPADRGSPAAPGQEDGA</p>	

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
133	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio Ig2 de <i>Mus musculus</i>	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGQTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLL WLQDAVPLAPVTGHSSQHSLLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGS QAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVT LELQGDGGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSPVPLEAWRPGQAQ PVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRK KETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELK EKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDD ILK VAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHLLYSRLGDQPVYLPTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSCLTAAEVHPAGR YVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
134	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio FN1 de <i>Mus musculus</i>	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGQTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLL WLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNL QAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTP YHIRISCSSSQGSPSWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQA FVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLE LQGDGGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSPVPLEAWRPGQAQPV HQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKE TRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEK LRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDD ILK VAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF QGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHLLYSRLGDQPVYLPTQML VKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFG LSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLY ALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLNLTALPPAQEPDEILYVN MDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSCLTAAEVHPAGR YVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
135	AXL de <i>Homo sapiens</i> - dominio FN2 de <i>Mus musculus</i>	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGQTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVS QPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEVDLL WLQDAVPLATAPGHGPQRS LHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVT SRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHT PYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNG SQVLVRWQEP RVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEVLMDIGLTREVT LELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGQP LHHLVSEPPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFETVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKE KL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAV KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMAD IASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLENMSVCVADFGLSKKIYN GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEI ATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELRELENTL KALPPAQEPDEILYVNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLC PSTT PSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
136	511 VH	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMNWVRQAPGK GLEWVSG ISGSGGHT YHADVSKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC AKDRYDILTGYYNLLDY WGQGTLTVTVSS	Ab de unión al dominio Ig2
137	CDR1 de VH 511	GFTFSSYA	
138	CDR2 de VH 511	ISGSGGHT	
139	CDR3 de VH 511	AKDRYDILTGYYNLLDY	
140	511 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISSW LAWYQQKPEEAP KSLIY AASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQ YNSYPLTF GGGAKVEIK	
141	CDR1 de VL 511	QGISSW	
	CDR2 de VL 511	AAS	
142	CDR3 de VL 511	QQYNSYPLT	
143	061 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTGYGISWVRQAPGQ GLEWIGWISAYNGNTNYVQNLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCARDHISMRLRGIIRNYWGQGTLTVTVSS	Ab de unión al dominio Ig1
144	061 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRS SWPRLTFGGGKVEIK	
145	137 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSRYAISWVRQAPGQ GLEWMGRIPIVGIANYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAREAGYSSSWYAEYFQHWGQGTLTVTVSS	
146	137 VL	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAP RLIYGASSRATGFPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPYTFGGGKLEIK	

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Comentarios
147	AXL de <i>Macaca fascicularis</i> (número de GenBank HB387229.1)	AWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTAQEEPSFVGNP GNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDGGQILELADSTQT QVPLGEDEQDDWIVVSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFV SQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDL LWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGV TSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGIYPLTHCTL QAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHPHTP YHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQ AFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL ELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQP VHQLVKETSAPAFSWPWWYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKK ETRYGEVFETVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKE KL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKLVAV KTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERE SFPAPVVILPFMKHGDLSHLLSRLGDQPVYLPTQMLVKFMAD IASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMNLNENMSVCVADFGLSKKIYN GDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEI ATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRC WELNPQDRPSFTELREDLNTL KALPPAQEPDEILYVNMDEGGG YPEPPGAAGGADPPTQLDPKDCSCLTSAEVHPAGRYVLC PSTA PSPAQPADRGSPAAPGQEDGA	
148-153		Véase el Ejemplo 3	

La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplos

5

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos contra AXL y de los CAF contra AXL

Primer conjunto de anticuerpos específicos de AXL

- 10 Se produjo un primer conjunto de anticuerpos monoclonales específicos de AXL (anticuerpos IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-726, IgG1-AXL-511, IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-733) inmunizando ratones transgénicos con construcciones o células de proteína AXL como se describe a continuación. Para más detalles sobre los procedimientos de inmunización, generación de hibridomas y espectrometría de masas de los anticuerpos purificados, véase el Ejemplo 1 del documento WO 2016/005593 A1.

15

Construcciones de expresión para AXL

- 20 Para la expresión de diversas variantes de AXL de longitud completa se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones: AXL humana (*Homo sapiens*) (n.º de registro de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de ser humano-macaco cangrejero en la que el dominio extracelular (ECD, *extracellular domain*) humano se reemplazó por el ECD de AXL de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (traducción del registro de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el ECD humano se reemplazó por el ECD de AXL de ratón (*Mus musculus*) (registro de Genbank NP_033491.2; aa 1-441), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I similar a Ig humano (aa 1-134, también denominado "dominio Ig1" en el presente documento) se reemplazó por el dominio I similar a Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II similar a Ig humano (aa 148-194, también denominado "dominio Ig2" en el presente documento) se reemplazó por el dominio II similar a Ig de AXL de ratón, ALX quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I similar a FNIII humano (aa 227-329, también denominado "dominio FN1" en el presente documento) se reemplazó por el dominio I similar a FNIII de AXL

25

de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II similar FNIII humano (aa 340-444, también denominado "dominio FN2" en el presente documento) se reemplazó por el dominio II similar a FNIII de AXL de ratón. Además, se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones de diversas variantes del ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de la AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta de His carboxiterminal (AXLECDHis), el dominio II similar a FNIII de la AXL humana (aa 327-447) con un péptido señal aminoterminal y una etiqueta de His carboxiterminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios de Ig1 e Ig2 de la AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta de His carboxiterminal (AXL-Ig12ECDHis).

Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC) (Kozak *et al.*, 1999). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.3 (Invitrogen).

Expresión de AXL en células EL4

Células EL4 se transfectaron de forma estable con el vector pcDNA3.3 que contenía la secuencia codificante de la AXL humana completa y se seleccionaron clones estables después la selección con el agente antibiótico, G418, (Geneticina).

Purificación de AXL con etiqueta de His

Las construcciones AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig12ECDHis, se expresaron en células HEK-293F. La etiqueta de His permite la purificación con cromatografía de afinidad de metales inmovilizados. En este proceso, un quelante fijado sobre la resina cromatográfica se carga con cationes Co^{2+} . Los sobrenadantes que contenían las proteínas con etiqueta de His se incubaron con la resina en modo discontinuo (es decir, en solución). Las proteínas con etiqueta de His se unen con fuerza a las perlas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen o se unen débilmente en comparación con las proteínas que llevan etiqueta de His. Después de la incubación, las perlas se recuperan del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava para eliminar las proteínas unidas débilmente. Las proteínas con etiqueta de histidina unidas con fuerza se eluyen después con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a Co^{2+} . El eluyente se elimina de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna desalinizadora.

Ensayo de detección homogéneo específico de antígeno

La presencia de anticuerpos contra AXL en sueros de ratones inmunizados o en sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma de HuMab (anticuerpo monoclonal humano), se determinó mediante ensayos de detección homogéneos específicos de antígeno usando tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT, *Fluorometric Micro volume Assay Technology*; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Para esto, se utilizaron dos diseños de ensayo diferentes con combinaciones de ensayos basados en 4 u 8 células.

El diseño de ensayo basado en 4 células se usó para analizar sueros de ratones inmunizados y como prueba de detección primaria del sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma. En el diseño de ensayo basado en 4 células se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a células A431 (DSMZ) y MDA-MB-231 (ambas expresan AXL en la superficie celular), así como la unión a células TH1021-AXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana de longitud completa; producidas como se ha descrito anteriormente) y HEK293 de tipo natural (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Las muestras de sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma se sometieron adicionalmente a un diseño de ensayo basado en 8 células. En el diseño de ensayo basado en 8 células se analizaron muestras para determinar la unión de anticuerpos humanos a células TH1021-hAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-macaco cangrejero en las que el ECD humano se había sustituido por el ECD de AXL de macaco cangrejero), TH1021-mAXL (células HEK-293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-ratón en las que el ECD humano se había sustituido por el ECD de AXL de ratón), TH1021-mIg1 (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio I similar a Ig sustituido por el dominio I similar a Ig de AXL de ratón), TH1021-mIg2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio II similar a Ig sustituido por el dominio II similar a Ig de AXL de ratón), TH1021-mFNI (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio I similar a FNIII sustituido por el dominio I similar a FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (células HEK-293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio II similar a FNIII sustituido por el dominio II similar a FNIII de AXL de ratón), y células HEK293 de tipo natural (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Las muestras se añadieron a las células para permitir que se unieran a la AXL. Posteriormente, la unión de HuMab se detectó usando un conjugado fluorescente (anticuerpo de cabra contra el Fc de IgG gamma humano conjugado con DyLight649; Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo de ratón humanizado específico de AXL, A0704P, (producido en células HEK-293F) se utilizó como control positivo y suero combinado de ratón-HuMab e IgG humana ChromPure, molécula entera (Jackson ImmunoResearch), respectivamente, se utilizaron como controles negativos. Las muestras se exploraron usando un sistema de detección celular de Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) y como lectura se usó

la fluorescencia media. Las muestras se consideraron positivas cuando los recuentos eran superiores a 50 y la fluorescencia x de los recuentos era al menos tres veces superior a la del control negativo.

Análisis de secuencia de los dominios variables del anticuerpo contra AXL y clonación en vectores de expresión

Se preparó ARN total a partir de 0,2 a 5x10⁶ células de hibridoma y el ADN complementario (ADNc) se preparó mediante 5'-RACE (5'-*Rapid Amplification of cDNA ends*, amplificación rápida de extremos de ADNc en el extremo 5') a partir de 100 ng de ARN total, usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes de VH y VL se amplificaron mediante PCR y se clonaron directamente, dentro del marco de lectura, en los vectores de expresión pG1f y pKappa, mediante clonación independiente de ligamiento (Aslanidis, C. y P.J. de Jong, *Nucleic Acids Res* 1990;18(20): 6069-74). Para cada anticuerpo, se secuenciaron 12 clones de VL y 12 clones de VH. Las secuencias resultantes se muestran en la Tabla 2. Las secuencias CDR se definieron de acuerdo con el IMGT (sistema de información internacional ImMunoGeneTics) (Lefranc *et al.*, 1999 y Brochet, 2008). Los clones con un marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) correcto se seleccionaron para su posterior estudio y expresión. Los vectores de todas las combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras que se encontraron se coexpresaron transitoriamente en células FreestyleTM 293-F utilizando el reactivo de transfección 293fectin.

Para los anticuerpos IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726, se generaron las siguientes variantes con mutaciones puntuales en los dominios variables: IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q e IgG1-AXL-726-M101L. Los mutantes se generaron mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit de mutagénesis Quickchange II (Stratagene).

Anticuerpos de control contra AXL

En algunos de los Ejemplos se usó un anticuerpo de comparación contra AXL (IgG1-YW327.6S2) que se ha descrito anteriormente (documento EP 2 220 131, U3 Pharma; documento WO 2011/159980, Genentech). Las secuencias VH y VL de estos anticuerpos específicos de AXL se clonaron en los vectores de expresión pG1f y pKappa.

Anticuerpo b12

En algunos de los ejemplos, el anticuerpo b12, un anticuerpo específico de gp120 (Barbas, 1993) se utilizó como control negativo.

Expresión

Los anticuerpos se expresaron como IgG1,κ. Las mezclas de ADN plasmídico que codificaban las cadenas tanto pesada como ligera de los anticuerpos, se transfectaron transitoriamente en células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectin (Invitrogen, EE.UU.) prácticamente como describe el fabricante.

Purificación de anticuerpos

El sobrenadante del cultivo se filtró en filtros sin salida de 0,2 µm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 ml (GE Health Care) y se eluyó con citrato sódico-NaOH 0,1 M, a pH 3. El eluido se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, a pH 9 y se dializó durante la noche en NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, a pH 7,4 (B. Braun). Como alternativa, después de la purificación, el eluido se cargó en una columna desalinizadora HiPrep y el anticuerpo se intercambió en tampón de NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o intercambio de tampón, las muestras se filtraron en filtros esterilizados sin salida de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración de IgG se midió con un Octet (Fortebio, Menlo Park, EE. UU.). Los anticuerpos purificados se conservaron a 4 °C.

Anticuerpo 511 específico de AXL

El anticuerpo IgG1-AXL-511 se produjo inmunizando ratones transgénicos con construcciones o células de proteína AXL como se describe a continuación, utilizando el procedimiento de selección descrito a continuación. Para más detalles sobre el procedimiento de inmunización, generación de hibridomas, aislamiento de ARN de esplenocitos, secuencias cebadoras, PCR de LEE y determinación y selección de secuencias HC y LC, véase el documento WO 2016/005593 A1.

Construcciones de expresión para AXL

Para la expresión de diversas variantes de AXL de longitud completa se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones: AXL humana (*Homo sapiens*) (n.º de registro de Genbank NP_068713.2), AXL quimérica de ser humano-macaco cangrejero en la que el dominio extracelular (ECD, *extracellular domain*) humano se reemplazó por el ECD de AXL de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (traducción del registro de Genbank HB387229.1; aa 1-447), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el ECD humano se reemplazó por el ECD de AXL de ratón (*Mus*

musculus) (registro de Genbank NP_033491.2; aa 1-441), AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I similar a Ig humana (aa 1-147, también denominado "dominio Ig1" en el presente documento) se reemplazó por el dominio I similar a Ig de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II similar a Ig humana (aa 148-227, también denominado "dominio Ig2" en el presente documento) se reemplazó por el dominio II similar a Ig de AXL de ratón, ALX quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio I similar a FNIII humano (aa 228-326, también denominado "dominio FN1" en el presente documento) se reemplazó por el dominio I similar a FNIII de AXL de ratón, AXL quimérica de ser humano-ratón en la que el dominio II similar a FNIII humano (aa 327-447, también denominado "dominio FN2" en el presente documento) se reemplazó por el dominio II similar a FNIII de AXL de ratón. Además, se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones de diversas variantes del ECD de AXL: el dominio extracelular (ECD) de la AXL humana (aa 1-447) con una etiqueta de His carboxiterminal (AXLECDHis), el dominio II similar a FNIII de la AXL humana (aa 327-447) con un péptido señal aminoterminal y una etiqueta de His carboxiterminal (AXL-FN2ECDHis), y los dominios de Ig1 e Ig2 de la AXL humana (aa 1-227) con una etiqueta de His carboxiterminal (AXL-Ig1ECDHis).

Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC) (Kozak *et al.* (1999) Gene 234: 187-208). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.3 (Invitrogen).

Expresión de AXL en células EL4

Células EL4 se transfectaron de forma estable con el vector pcDNA3.3 que contenía la secuencia codificante de la AXL humana de longitud completa y se seleccionaron clones estables después de la selección con el agente antibiótico, G418, (Geneticina).

Purificación de AXL con etiqueta de His

Las construcciones AXLECDHis, AXL-FN2ECDHis y AXL-Ig1ECDHis se expresaron en células HEK293F y se purificaron con cromatografía de afinidad de metales inmovilizados.

Expresión transitoria en células HEK-293

Los anticuerpos se expresaron como IgG1,κ. Las mezclas de ADN plasmídico que codificaban las cadenas tanto pesada como ligera de los anticuerpos, se transfectaron transitoriamente en células 293-F Freestyle (HEK293F) (Life technologies, EE.UU.) utilizando 293fectin (Life technologies) prácticamente como se describe en Vink, T., *et al.* (2014) ('A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies', Methods, 65 (1), 5-10).

Para la expresión LEE de los Ab, se mezclaron 1 µl de la mezcla de reacción PCR LEE de HC, 1 µl de la mezcla de reacción PCR de LC y 1 µl de una mezcla potenciadora de 30 ng/µl que contenía una mezcla de 3 plásmidos potenciadores de la expresión como se describe en Vink, T., *et al.* (2014) y se transfectaron en células HEK293F en un volumen total de 100 µl utilizando 293fectin como reactivo de transfección, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life technologies), usando como recipiente placas de 96 pocillos, prácticamente como se ha descrito anteriormente.

ELISA para AXLECDHis

Placas ELISA (Greiner, Países Bajos) se recubrieron con 100 µl/pocillo de AXLECDHis 0,5 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente (TA). Se retiró la solución de recubrimiento y los pocillos se bloquearon añadiendo 150 µl de PBSTC (PBS que contenía tween-20 al 0,1 % y suero de pollo al 2 %) y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de PBST (PBS que contenía tween-20 al 0,1 %)/pocillo y se añadieron 100 µl de solución de prueba, seguido de una incubación de 1 hora a TA. Después de lavar tres veces con 300 µl de PBST/pocillo, se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra contra IgG humana acoplado con peroxidasa de rábano caballo (diluido a 1/3000) y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de lavar tres veces con 300 µl de PBST/pocillo, se añadieron 100 µl de solución de ABTS (1 mg/ml) y se incubaron a TA hasta que se observó suficiente señal y la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de solución de ácido oxálico al 2 %. Las lecturas de las placas de 96 pocillos se midieron en un lector ELISA a 405 nm.

Detección de diversidad

Se analizaron las muestras para determinar la unión de los anticuerpos a células TH1021-hAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana), TH1021-cAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-macaco cangrejero en las que el ECD humano se había sustituido por el ECD de AXL de macaco cangrejero), TH1021-mAXL (células HEK293F que expresan transitoriamente quimeras de AXL de ser humano-ratón en las que el ECD humano se había sustituido por el ECD de AXL de ratón), TH1021-mIg1 (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio I similar a Ig sustituido por el dominio I similar a Ig de AXL de ratón), TH1021-mIg2 (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio II similar a Ig sustituido por el dominio II similar a Ig de AXL de ratón), TH1021-mFNI (células HEK293F que expresan

transitoriamente la AXL humana con el dominio I similar a FNIII sustituido por el dominio I similar a FNIII de AXL de ratón), TH1021-mFN2 (células HEK293F que expresan transitoriamente la AXL humana con el dominio II similar a FNIII sustituido por el dominio II similar a FNIII de AXL de ratón), y células HEK293F (control negativo que no expresa AXL), respectivamente.

Se añadieron muestras de la expresión LEE a las células para permitir la unión a las distintas construcciones de AXL. Posteriormente, la unión de HuMab se detectó usando un conjugado fluorescente (anticuerpo de cabra contra IgG humana conjugado con DyLight649; Jackson ImmunoResearch). Las muestras se exploraron usando un sistema de detección celular de Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) y como lectura se usó la fluorescencia media. Las muestras se consideraron positivas cuando los recuentos eran superiores a 50 y la fluorescencia x de los recuentos era al menos tres veces superior a la del control negativo.

Afinidad de unión del anticuerpo 511

Se determinó la afinidad de un anticuerpo contra AXL (clon 511).

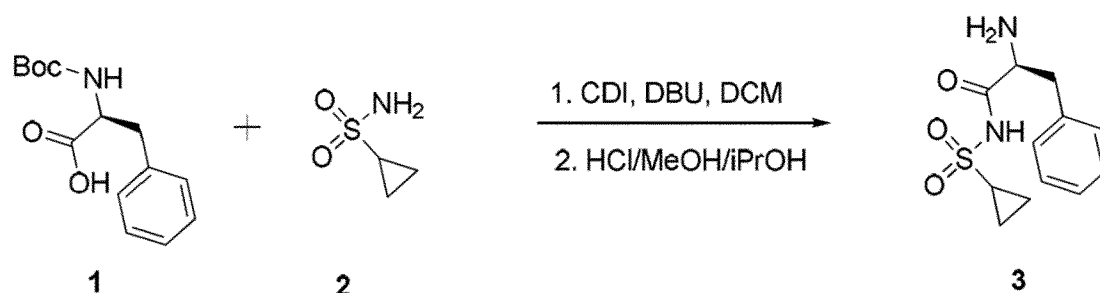
La afinidad se determinó utilizando interferometría de biocapa en un ForteBio OctetRED384. Los biosensores de captura contra la región Fc humana (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; n.º de cat. 18-5064) se cargaron durante 150 s con hlgG (1 µg/ml) con una respuesta de carga de 1 nm. Después de un valor inicial (150 s) se determinó la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de AXLECDHis (como se describe en el Ejemplo 1), usando un intervalo de concentración de 10 µg/ml - 0,16 µg/ml (218 nM - 3 nM) con etapas de dilución de factor 2. Para los cálculos, se usó la masa molecular teórica de AXLECDHis basada en la secuencia de aminoácidos, es decir, 46 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo en un OctetRED384, mientras se agita a 1000 rpm y a 30 °C. Cada anticuerpo se probó en tres experimentos independientes.

Los datos se analizaron con el programa informático de análisis de datos ForteBio v7.0.3.1, usando el modelo 1:1 y un ajuste completo global con un tiempo de asociación de 1000 s y un tiempo de disociación de 1000 s, a menos que se indique lo contrario. Se usó un tiempo de disociación de 1000 s (en lugar del tiempo de disociación de 2000 s que se adquirió) ya que así se obtuvieron mejores ajustes. Los trazos de datos se corrigieron restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del valor inicial y se aplicó la corrección entre etapas así como el filtrado de Savitzky-Golay.

La afinidad (K_D) del clon 511 por AXL fue de $23 \cdot 10^{-9}$ M (k_{on} $1,7 \cdot 10^5$ 1/Ms y un k_{dis} de $3,9 \cdot 10^{-3}$ 1/s).

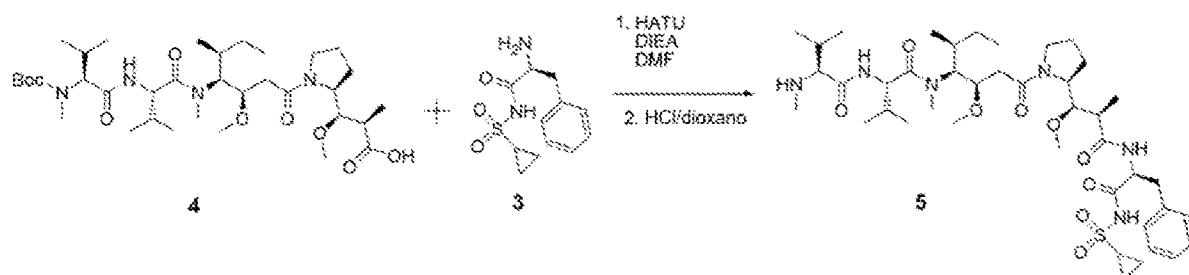
Síntesis de duostatina-3.

Preparación del compuesto 3:



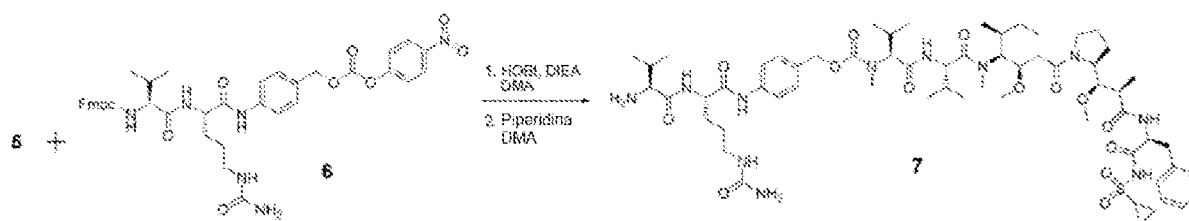
A una solución de Boc-L-fenilalanina 1 (5,36 g *et al.*, 20,2 mmol) en 30 ml de diclorometano (DCM) se añadió carbonildiimidazol (CDI), 4,26 g, 26,3 mmol) y se agitó durante 1 hora. A continuación se añadió una solución de 2 (3,67 g, 30,3 mmol) y ácido 2,4-diaminobutírico (DBU, 4,5 ml, 30 mmol) en 15 ml de DCM. La mezcla se calentó a 40 °C durante 16 horas. La mezcla se diluyó con 60 ml de DCM y 40 ml de agua, a continuación se neutralizó a pH 7 con HCl concentrado. El extracto de DCM se recogió, se lavó con HCl 0,2 M (60 ml), a continuación con salmuera (60 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó para dar 7,47 g de sulfonamida protegida con Boc. Este material se suspendió en 40 ml de metanol, a continuación se añadieron 200 ml de HCl 6 N/isopropanol y la mezcla se agitó durante 2 horas. El disolvente se evaporó al vacío, a continuación se añadieron 100 ml de éter. El precipitado se recogió por filtración y se secó para dar el compuesto 3 como sal de HCl (5,93 g, 96 %); MS m/z 269,1 (M + H).

Preparación del compuesto 5:



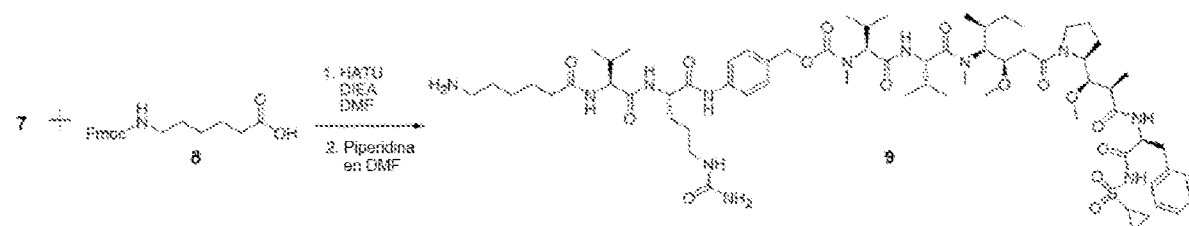
A una solución del compuesto 4 (1,09 g, 1,6 mmol) en 10 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) se añadió hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 0,61 g, 1,6 mmol), diisopropiletilamina (DIEA, 0,56 ml) y el compuesto 3 (0,49 g, 1,6 mmol) en ese orden. La mezcla se agitó durante 1 hora y se diluyó con 100 ml de agua y 4 ml de ácido acético. El precipitado se recogió por filtración, se secó al vacío y se añadió a 10 ml de HCl 4 M/dioxano. Después de 30 min *et al.*, se añadieron 200 ml de éter y el precipitado insoluble se recogió y se purificó por HPLC para dar el compuesto 5 como sal de tetrahidrofurano (TFA, 1,3 g, 88 %); MS m/z 835,5 (M+H). El compuesto 5 se denomina duostatina-3 en todo el manuscrito.

Preparación del compuesto 7:



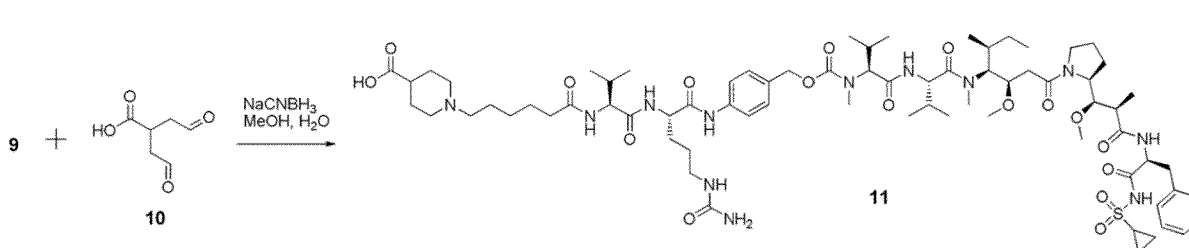
A una solución del compuesto 5 (500 mg, 0,527 mmol) en 5 ml de DMF se añadió el compuesto 6 (483 mg, 0,631 mmol), N-hidroxibenzotriazol (HOBt, 40 mg, 0,296 mmol), y DIEA (0,27 ml). La mezcla se agitó durante 16 horas, tras lo cual se añadieron 0,4 ml de piperidina. Después de 1 hora, la mezcla se diluyó con 100 ml de éter y el precipitado se recogió y se secó para dar el compuesto 7 como sal de HCl (640 mg, 95 %); MS m/z 1240,7 (M+H).

Preparación del compuesto 9:



A una solución del compuesto 8 (219 mg, 0,62 mmol) en 5 ml de DMF se añadió HATU (236 mg, 0,62 mmol), DIEA (0,15 ml), y el compuesto 7 (316 mg, 1,6 mmol), respectivamente. Después de 1 hora, se añadieron 0,2 ml de piperidina y la mezcla se agitó durante 30 min, a continuación se purificó por HPLC para dar el compuesto 9 como sal de TFA (235 mg, 64 %); MS m/z 1353,8 (M+H).

Preparación del compuesto 11:



A una solución del compuesto 9 (235 mg, 0,16 mmol) en 2 ml de metanol y 1 ml de agua se añadió una solución de

dialdehído 10 (1,6 ml de 0,3 M en iPrOH) y NaCNBH₃ (180 mg, 2,85 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas a TA, y a continuación se purificó por HPLC dando lugar al compuesto 11 como sal de TFA (126 mg, 50 %); MS m/z 1465,8 (M+H)

5 Generación de conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) específicos de AXL

Anticuerpos AXL purificados IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-726, así como el anticuerpo de control negativo IgG1-b12, se conjugaron con Duostatin-3 de Concortis Biosystems, Inc. (San Diego, CA) a través de conjugación covalente utilizando el enlazador K-lock AV1-valina-citrulina (vc) (documentos WO 2013/173391, WO 2013/173392 y WO 2013/173393 de Concortis Biosystems).

Posteriormente se analizaron los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL para determinar la concentración (mediante absorbancia a 280 nm), la relación fármaco-anticuerpo (DAR) mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco no conjugado (mediante cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxinas (mediante ensayo LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*). Los resultados fueron los siguientes (Tabla 3):

Tabla 3

	IgG1-AXL-148-vcDuostatina3	IgG1-AXL-183-vcDuostatina3	IgG1-AXL-726-vcDuostatina3	IgG1-b12-vcDuostatina3
Concentración (mg/ml)	6,57	3,40	5,93	3,36
DAR mediante HIC-HPLC	1,71	1,79	1,77	2,05
% de fármaco no conjugado	6,67	4,16	5,38	4,19
% de agregación mediante SEC-HPLC	3,71 %	3,35	3,42	1,75

Ejemplo 2: Características de unión de los anticuerpos contra AXL

Afinidad de unión de los anticuerpos contra AXL

Las afinidades del panel de 9 anticuerpos contra AXL así como 3 variantes de estos anticuerpos con mutaciones de un solo aminoácido en los dominios variables (IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-183-N52Q, IgG1-AXL-726-M101L) se determinaron.

Las afinidades se determinaron mediante interferometría de biocapa en un ForteBio OctetRED384. Los biosensores de captura contra la región Fc humana (AHC) (ForteBio, Portsmouth, Reino Unido; n.º de cat. 18-5064) se cargaron durante 150 s con hIgG (1 µg/ml) con una respuesta de carga de 1 nm. Después de un valor inicial (150 s) se determinó la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de AXLECDHis (como se describe en el Ejemplo 1), usando un intervalo de concentración de 10 µg/ml - 0,16 µg/ml (218 nM - 3 nM) con etapas de dilución de factor 2. Para los cálculos, se usó la masa molecular teórica de AXLECDHis basada en la secuencia de aminoácidos, es decir, 46 kDa. Los experimentos se llevaron a cabo en un OctetRED384, mientras se agita a 1000 rpm y a 30 °C. Cada anticuerpo se probó en tres experimentos independientes.

Los datos se analizaron con el programa informático de análisis de datos ForteBio v7.0.3.1, usando el modelo 1:1 y un ajuste completo global con un tiempo de asociación de 1000 s y un tiempo de disociación de 1000 s, a menos que se indique lo contrario. Se usó un tiempo de disociación de 1000 s (en lugar del tiempo de disociación de 2000 s que se adquirió) ya que así se obtuvieron mejores ajustes. Para los anticuerpos IgG1-AXL-154 e IgG1-AXL-154-M103L se utilizó un tiempo de disociación de 500 s. Para IgG1-AXL-012 e IgG1-AXL-094 se usaron tiempos de disociación de 200 s. Los trazos de datos se corrigieron restando una curva de referencia (anticuerpo sin AXLECDHis), el eje Y se alineó con los últimos 5 s del valor inicial y se aplicó la corrección entre etapas así como el filtrado de Savitzky-Golay.

Las afinidades (K_D) de los anticuerpos contra AXL variaron de $0,3 \cdot 10^{-9}$ M a $63 \cdot 10^{-9}$ M (Tabla 4). Para la IgG1-AXL-183-N52Q mutante la K_D fue menor que para la IgG1-AXL-183 de tipo natural, debido a una velocidad de disociación aproximadamente 2,5 veces mayor. La cinética observada de los otros dos mutantes fue similar a la cinética de las IgG de tipo natural.

Tabla 4

Anticuerpo	Afinidad de unión (OCTET)		
	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
IgG1-AXL-107	$16 \cdot 10^{-9}$	$2,8 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^{-3}$

(continuación)

Anticuerpo	Afinidad de unión (OCTET)		
	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
IgG1-AXL-148	20*10 ⁻⁹	2,3*10 ⁵	4,4*10 ⁻³
IgG1-AXL-154	7,2*10 ⁻⁹	2,6*10 ⁵	1,9*10 ⁻³
IgG1-AXL-154-M103L	7,8*10 ⁻⁹	2,7*10 ⁵	2,0*10 ⁻³
IgG1-AXL-171	17*10 ⁻⁹	1,1*10 ⁵	1,8*10 ⁻³
IgG1-AXL-183	10,2*10 ⁻⁹	4,1*10 ⁴	4,2*10 ⁻⁴
IgG1-AXL-183-N52Q	24*10 ⁻⁹	4,2*10 ⁴	1,0*10 ⁻³
IgG1-AXL-613	1,5*10 ⁻⁹	5,4*10 ⁵	8,0*10 ⁻⁴
IgG1-AXL-726	0,6*10 ⁻⁹	2,4*10 ⁵	1,3*10 ⁻⁴
IgG1-AXL-726-M101L	0,3*10 ⁻⁹	2,1*10 ⁵	6,9*10 ⁻⁵
IgG1-AXL-733	63*10 ⁻⁹	1,6*10 ⁵	9,7*10 ⁻³

Unión de anticuerpos contra AXL a la AXL de ser humano, de ratón y de macaco cangrejero

- 5 Se transfectaron transitoriamente células HEK293T con construcciones de expresión para la AXL humana de longitud completa, la AXL humana con un dominio extracelular (ECD) de macaco cangrejero o la AXL humana con un ECD de ratón (véase el Ejemplo 1). La unión de los anticuerpos HuMab-AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Células HEK293 transfectadas se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,0024-10 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron con anticuerpo de cabra contra la región F(ab')₂ de IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) de *Rhodophyta* (R) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; n.º de cat. 109-116-098) diluido a 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (volumen final de 100 µl). A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 µl de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences).

15 Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

- 20 La **Figura 1A** muestra que los anticuerpos HuMab-AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresaban el ECD de la AXL humana. Por otro lado, los anticuerpos HuMab-AXL reconocieron la AXL con un ECD de macaco cangrejero, con valores de CE₅₀ en el mismo intervalo que para la AXL completamente humana (**Figura 1B**). Por el contrario, la unión de los HuMab a AXL con un ECD de ratón fue baja (IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-154-M103L, IgG1-AXL-733, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-183-N52Q) o no detectable (IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-726, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-148; **Figura 1C**). Como se esperaba, el anticuerpo de control negativo IgG1-b12 (**Figura 1**) no mostró ninguna unión a las células que expresaban ninguna de las variantes de AXL. La Tabla 5 muestra los valores de CE₅₀ y las desviaciones estándar (d.e.) de la unión de los anticuerpos contra AXL a la AXL humana o a la AXL humana con un ECD de AXL de macaco cangrejero (determinado en al menos 3 experimentos). Los valores de CE₅₀ de la unión a la AXL humana con un ECD de AXL de ratón no pudieron determinarse a una unión muy baja o ausente.

30 **Tabla 5**

Anticuerpo	Unión CE ₅₀ (µg/ml)	
	Promedio de AXL humana (d.e.)	Promedio AXL de macaco cangrejero (d.e.)
IgG1-AXL-107	0,050 (0,004)	0,149 (0,021)
IgG1-AXL-154	0,105 (0,003)	0,160 (0,027)
IgG1-AXL-154-M103L	0,110 (0,038)	0,161 (0,042)
IgG1-AXL-171	0,073 (0,023)	0,157 (0,057)
IgG1-AXL-613	0,040 (0,023)	0,146 (0,023)
IgG1-AXL-726	0,288 (0,206)	0,349 (0,160)
IgG1-AXL-726-M101L	0,184 (0,117)	0,250 (0,066)
IgG1-AXL-733	0,176 (0,094)	0,254 (0,114)

(continuación)

Anticuerpo	Unión CE ₅₀ (µg/ml)	
	Promedio de AXL humana (d.e.)	Promedio AXL de macaco cangrejero (d.e.)
IgG1-AXL-148	0,094 (0,059)	0,152 (0,080)
IgG1-AXL-183	0,526 (0,177)	0,309 (0,086)
IgG1-AXL-183-N52Q	0,350 (0,206)	0,324 (0,121)

Competición entre anticuerpos contra AXL y Gas6 por la unión a AXL

5 Se probó si el ligando de AXL, Gas6, interfería con la unión a AXL de los anticuerpos contra AXL. Por lo tanto, se incubaron células A431 positivas a AXL durante 15 minutos a 4 °C con 10 µg/ml de Gas6 humano recombinante (R&D Systems, Abingdon, RU; n.º de cat. 885-GS). Posteriormente, se prepararon diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final de 0,014-10 µg/ml), se añadieron a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron en 100 µl con anticuerpo secundario a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Como anticuerpo secundario que se une a la región Fc, se utilizó anticuerpo de cabra contra la región F(ab')₂ de IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat. n.º 109-116-098) diluido a 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 µl de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences).

15 Como alternativa, las células A431 se preincubaron con 10 µg/ml de anticuerpos contra AXL (15 minutos, 4 °C) para evaluar si el ligando de AXL, Gas6, aún podía unirse en presencia de anticuerpos contra AXL. Después de la preincubación del anticuerpo, se añadieron diluciones en serie de Gas6 humano recombinante (R&D Systems, Abingdon, RU; cat. n.º 885-GS) a las células a concentraciones finales de 0,001-20 µg/ml y se incubaron durante 20 30 minutos a 4 °C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron con anticuerpo de ratón contra Gas6 IgG2a (R&D Systems; n.º de cat. MAB885) a 4 °C durante 30 min. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron con anticuerpo de cabra contra IgG de ratón marcada con FITC (Dako, Heverlee, Bélgica; n.º de cat. F049702) a 4 °C durante 30 min en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 µl de 25 PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

30 En experimentos (n=3) en los que las células A431 se preincubaron con Gas6, los valores de unión máximos de los anticuerpos contra AXL fueron comparables a los de la unión de los anticuerpos en ausencia de Gas6 (la unión máxima después de la preincubación con Gas6 fue de 90-108 % de la unión sin preincubación con Gas6) (Tabla 6). Los valores de CE₅₀ para la unión del anticuerpo AXL con o sin preincubación con Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo mejorados después de la preincubación con Gas6 (Tabla 6).

35 La unión del anticuerpo AXL de control YW327.6S2 a las células A431 se redujo considerablemente en presencia de Gas6 en comparación con la unión sin Gas. La unión máxima de YW327.6S2 en presencia de Gas6 fue del 19 % de la unión sin Gas6, y el valor de CE₅₀ para la unión a células A431 fue 21 veces mayor cuando las células se preincubaron con Gas6.

40 En experimentos en los que se preincubaron células A431 con anticuerpos contra AXL, se evaluó la unión de Gas6 (n=3). La unión de Gas6 a células A431 fue similar con o sin preincubación con anticuerpos HuMab-AXL. Las concentraciones promedio de CE₅₀ de unión a Gas6 cuando las células se preincubaron con los HuMab (0,34-0,83 µg/ml) y de la unión máxima de Gas6 fueron similares a las de la unión a Gas6 en presencia del anticuerpo de control negativo b12 (concentración de CE₅₀: 0,40 µg/ml; 95-115 % de unión de Gas6 en presencia del anticuerpo de control b12). La unión de Gas6 a las células A431 se redujo considerablemente en presencia del anticuerpo AXL de control YW327.6S2 en comparación con la preincubación con b12 (la concentración de CE₅₀ fue 14 veces mayor). La unión máxima de Gas6 en presencia del anticuerpo de control YW327.6S2 fue del 17 % de la unión en presencia del anticuerpo de control negativo b12.

Tabla 6

Anticuerpo	Unión de anticuerpo a células A431			Unión de Gas6 a células A431	
	CE ₅₀ sin Gas6 CE ₅₀ (µg/ml) media (d. e.)	CE ₅₀ en presencia de Gas6 (µg/ml) media (d.e.)	Unión máxima en presencia de Gas6 (% de unión en ausencia de Gas6) media (d.e.)	CE ₅₀ en presencia de anticuerpos AXL (µg/ml) media (d.e.)	Unión máxima en presencia de anticuerpos AXL (% de unión en presencia de anticuerpo de control) media (d.e.)
IgG1-AXL-107	0,16 (0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-148	0,11 (0,13)	0,20 (0,30)	93 (5)	0,73 (0,52)	106 (7)
IgG1-AXL-154	0,42 (0,55)	0,76 (0,78)	99 (13)	0,44 (0,28)	95 (10)
IgG1-AXL-171	0,18 (0,21)	0,32 (0,40)	95 (5)	0,69 (0,42)	108 (5)
IgG1-AXL-183	0,69 (0,72)	1,19 (1,11)	90 (19)	0,34 (0,13)	115 (8)
IgG1-AXL-511	0,12 (0,11)	0,30 (0,31)	93 (15)	0,74 (0,44)	113 (6)
IgG1-AXL-513	0,09 (0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)
IgG1-AXL-726	0,32 (0,35)	0,55 (0,69)	97 (10)	0,77 (0,58)	98 (10)
IgG1-AXL-733	0,49 (0,51)	0,62 (0,23)	93 (5)	0,83 (0,54)	96 (5)
YW327.5S2	0,09 (0,09)	1,90 (1,04)*	41 (24)	5,53 (7,09)*	17 (10)
b12	n.a. ^a	n.a.	n.a.	0,40 (0,11)	100

^a n.a., no aplicable

* Los valores de CE₅₀ son menos precisos debido a la baja unión.

Ejemplo 3: Panel de anticuerpos contra AXL para estudios de mapeo de epítomos

5

Determinación de la especificidad del dominio de AXL usando moléculas quiméricas de AXL de ser humano-ratón

La especificidad del dominio de AXL de los anticuerpos contra AXL se determinó usando un panel de mutantes de AXL quiméricos de ser humano-ratón. Se generaron cinco moléculas quiméricas de AXL diferentes, en donde el dominio I similar a Ig (Ig1) humano, el dominio II similar a Ig (Ig2), el dominio I similar a FNIII (FN1) humano o el dominio II similar a FNIII (FN2) humano, se reemplazaron por sus homólogos murinos.

10

Para la expresión de las quimeras de AXL de ser humano-ratón se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones y se expresaron en células HEK293F como se describe en el Ejemplo 1:

15

AXL de *Homo sapiens* (p33-HAHs-AXL): (SEQ ID NO:148)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAPRGTOAEESPFVGNPGNITGARGLTG
 TLRCQLQVQGEPPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFV
 SQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLSLHVPGLNKTSS
 FSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSNDGMGIQAGEPDP
 PEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHW
 QEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGVSNTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWR
 PGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGELVVRYRVRK
 SYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSEL
 EDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFMA
 DIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKS

 DVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLE
 NTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTTPSPAQP
 ADRGSPAAPGQEDGA

5 **AXL de *Mus musculus* (p33-HAMm-AXL):** (SEQ ID NO:149)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMYPYDVPDYAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGL
 TGTLRCELQVQGEPPEVWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQLRISALQLSDAGEYQCMVHLEG
 RTFVSQPGFVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSLQTPGLNK
 TSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGWIWLGK
 SDPPEDPLTLQVSVPQHRLREKLLPHTPYHIRISCSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLV
 RWQEPRVPLQGTLLGYRLAYRGQDTPEVLMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPW
 RPGQGQPLHHLVSEPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGELVVRYRVR
 KSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSE
 LEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPYYLPTQMLVKFM
 ADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSK
 SDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDL
 ENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTTPSPAQ
 PADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* AXL - Dominio de Ig1 de *Mus musculus* (p33-AXL-mIg1): (SEQ ID NO:150)

MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGEPPEVV
WLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLISALQLSDAGEYQCMVHLEGRTFVSQPGFVGLEGLPYFL
EPEPDRTPAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSR
TATITVLPQQPRNLHLVSRQPTTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQ
LRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYR
LAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEP
STPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGIS
EELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKLVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHP
NVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHR
DLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATR
GQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILY
VNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* AXL - Dominio de Ig2 de *Mus musculus* (p33-AXL-mlg2): (SEQ ID NO:151)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEPSFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQV
QGEPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGL
EGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGHSSQHSQTPGLNKTSSFSCEAHNAK
GVTTSRATITVLPQQPRNLHLVSRQPTTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQAS
VPPHQRLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGT
LLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQ
LVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATL
NSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSI

ILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHG
DLHSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGD
YYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRQTPYPGVENSEIYDYLQGNRLKQPADCLD
GLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

5

AXL de *Homo sapiens* AXL - Dominio de FN1 de *Mus musculus* (p33-AXL-mFNI): (SEQ ID NO:152)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPEVHWLR
 DGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLPYFLEEPED
 RTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQPSRLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRTATIT
 VLPQRPHHLHVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEK
 LLPHTPYHIRISCSSSQGSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGG
 DTPEVLM DIGLRQEVTLELQGDGVSNTLVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFS
 WPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEK
 LRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMR
 LIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAAR
 NCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRKAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVTMWEIATRGQTPY
 PGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTL KALPPAQEPDEILYVNMDE
 GGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTAAEVHPAGRYVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

AXL de *Homo sapiens* AXL - Dominio de FN2 de *Mus musculus* (p33-AXL-mFN2): (SEQ ID NO:153)

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQV
 QGEPPEVHWLRDGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGL
 EGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGQPSRLHVPGLNKTSSFSCEAHNA
 KGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQ
 ASVPPHQLRLGSLPHPTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLVRWQEPVRPL
 QGTLLGYRLAYRGQDTPEVLM DIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPGQGQPLH
 HLVSEPPPPRAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEAT
 LNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVC
 MKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQTMLVKFMADIASGMEYL
 STKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRKAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVVSFGVT
 MWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTL KALPPA
 QEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTAAEVHPAGRYVLC PSTTPSPAQPADRGSPAAP
 PGQEDGA

10 La unión de 1 µg/ml de anticuerpo contra AXL a las quimeras de AXL de ser humano-ratón se determinó mediante citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 2. Se incluyó IgG1-b12 como una IgG1 de control de isotipo.

15 Todos los anticuerpos contra AXL mostraron unión a la AXL humana (**Figura 2A**), mientras que la unión se anuló o se redujo fuertemente cuando el ECD de la AXL humana se sustituyó por su homólogo murino (**Figura 2B**). Para confirmar la expresión de hsAXL-mmECD se incluyó el anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón YW327.6S2 de reacción cruzada.

20 Los anticuerpos contra AXL 107 y 613 mostraron unión fuertemente reducida a hsAXL-mmIg1 (**Figura 2C**), lo que indica el reconocimiento de un epítipo en el dominio de Ig1 de AXL. IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-171 mostraron unión fuertemente reducida a hsAXL-mmIg2 (**Figura 2D**), lo que indica el reconocimiento de un epítipo en el dominio de Ig2 de AXL. IgG1-AXL-154, IgG1-AXL-183 e IgG1-AXL-733 mostraron unión reducida a hsAXL-mmFN1 (**Figura 2E**), indicativa de un epítipo de unión en el dominio de FN1 de AXL. Por último, la unión de IgG1-AXL-726 se perdió en hsAXL-mmFN2 (**Figura 2F**), lo que indica el reconocimiento de un epítipo dentro del dominio de FN2.

La especificidad del dominio de AXL por todos los anticuerpos contra AXL se resume en la Tabla 7.

Tabla 7

5

Anticuerpo	Especificidad del dominio de AXL	aa de AXL implicados en la unión
IgG1-AXL-107	Ig1	L121-Q129
IgG1-AXL-148	Ig2	D170-R190
IgG1-AXL-154	Fn1	Q272-A287, G297-P301
IgG1-AXL-154-M103L	n.d. ^a	n.d.
IgG1-AXL-171	Ig2	P170, T182-R190
IgG1-AXL-183	Fn1	Sin resolver
IgG1-AXL-183-N52Q	n.d.	n.d.
IgG1-AXL-613	Ig1	T112-Q124
IgG1-AXL-726	Fn2	A359, R386, Q436-K439
IgG1-AXL-726-M101L	n.d.	n.d.
IgG1-AXL-733	Fn1	Sin resolver
IgG1-AXL-061	Ig1	I97-Q124
IgG1-AXL-137	Ig1	Q57, E92-T105
YW327.6S2	Ig1	G39-D59

^a n.d., no determinado

Mapeo de epítomos de alta resolución para identificar aminoácidos en el dominio extracelular de AXL implicado en la unión de anticuerpos contra AXL

10

Para identificar aminoácidos en el dominio extracelular de AXL implicados en la unión de anticuerpos contra AXL, se generó una biblioteca de variantes de secuencia de AXL a través de la recombinación de secuencias de AXL derivadas de especies con niveles variables de homología con la secuencia de AXL humana en el dominio extracelular. Resumiendo, se mezcló un plásmido de expresión que codifica la AXL humana (Hs) con plásmidos de clonación que codifican homólogos de AXL de *Mus musculus* (Mm), *Monodelphis domestica* (Md; zarigüeya), *Anolis carolinensis* (Ac; lagarto) y *Tetraodon nigroviridis* (Tn; pez globo) o viceversa. Se usó una combinación de dos cebadores específicos del vector de clonación o de expresión para realizar una PCR que amplifica el dominio extracelular (ECD) de AXL con un tiempo de alargamiento abreviado, forzando la fusión y la reasociación de las cadenas de replicación de ADN nacientes durante el ciclo de PCR. El ECD de longitud completa se amplificó mediante una PCR anidada, de nuevo específica para productos de recombinación que contienen extremos procedentes de ambos vectores.

15

20

Los productos de la PCR del ECD de AXL resultantes se clonaron en un vector de expresión creando la AXL de longitud completa y los plásmidos resultantes se secuenciaron, se clasificaron por diferencia máxima con respecto a los vectores de molde y se seleccionaron para crear un conjunto mínimo con máximo poder de diferenciación. Los plásmidos que codifican los homólogos de AXL de Hs, Mm, Md, Ac y Tn, cuatro plásmidos quiméricos de ser humano/ratón que codifican la AXL de Hs con los dominios de Ig1, Ig2, Fn1 o Fn2 de murino, y los dieciséis plásmidos más diferenciadores de la biblioteca de recombinación, se transfectaron en células HEK293-F de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por el fabricante (Life technologies). Los datos de unión por FACS usando 1 µg/ml de anticuerpos contra AXL se desconvolucionaron puntuando por aminoácido si la mutación se correlacionaba (+1) o no (-1) con la pérdida de unión, después de lo cual se aplicó una corrección de referencia y una normalización a una escala de -5 a +5, dando como resultado una puntuación de impacto por aminoácido sobre el ECD completo.

25

30

Los datos de unión desconvolucionados se resumen en la Tabla 7 como los aminoácidos implicados en la unión. Los anticuerpos cuyos sitios de unión no pudieron mapearse en alta resolución debido a la ausencia de acontecimientos de recombinación en la proximidad del sitio de unión, se indican como no resueltos.

35

Ejemplo 4 - Funciones efectoras mediadas por Fc

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC)

40

La capacidad de los anticuerpos contra AXL para inducir ADCC de células de carcinoma epidermoide A431, se

determinó como se explica a continuación. Como células efectoras, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos (UMC Utrecht, Países Bajos).

Etiquetado de células diana

Se recogieron células A431 (5×10^6 células) en medio de cultivo (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FSC) al 10 %, a las que se añadieron 100 μCi de ^{51}Cr (Cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos), y la mezcla se incubó en un baño María a 37 °C durante 1 hora (hr) mientras se agitaba. Después de lavar las células (dos veces en PBS, a 1200 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en RPMI1640/FSC al 10 % y se contaron por exclusión con azul de tripano. Las células se diluyeron hasta una densidad de 1×10^5 células/ml.

Preparación de células efectoras

Células mononucleares de sangre periférica (voluntarios sanos, UMC Utrecht, Utrecht, Países Bajos) se aislaron de 45 ml de sangre recién extraída con heparina mediante Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, cat 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de volver a suspender las células en RPMI1640/FSC al 10 %, se contaron por exclusión con azul de tripano y se diluyeron a una densidad de 1×10^7 células/ml.

Establecimiento de ADCC

Se pipetearon 50 μl de células diana marcadas con ^{51}Cr en placas de 96 pocillos y se añadieron 50 μl de anticuerpo, diluido en RPMI1640/FSC al 10 % (diluciones de factor 3 a concentraciones finales en el intervalo de 0,01-10 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron (a temperatura ambiente (TA), 15 min) y se añadieron 50 μl de células efectoras, dando lugar a una relación de célula efectora/diana de 100:1 (para determinar la lisis máxima, se añadieron 100 μl de Triton-X100 al 5 % en lugar de células efectoras; para determinar la lisis espontánea, se utilizaron 50 μl de células diana y 100 μl de RPMI1640/FSC al 10 %). Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y con CO_2 al 5 %. Después de centrifugar las células (a 1200 rpm, 10 min), se recogieron 70 μl de sobrenadante en tubos Micronic y se contaron en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

% de lisis específica = $(\text{rpm de la muestra} - \text{rpm sólo de células diana}) / (\text{rpm de lisis máxima} - \text{rpm sólo de células diana})$, en donde rpm significa recuentos por minuto.

IgG-AXL-183-N52Q e IgG1-AXL-733 indujeron una ADCC del 15 al 21 % en células A431 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 3**). IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-726-M101L, IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-154-M103L no indujeron ninguna ADCC significativa en las células A431 a concentraciones de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 3**).

Ejemplo 5 - Características de unión de los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL (CAF-AXL)

Se transfectaron transitoriamente células HEK293T con construcciones de expresión para la AXL humana de longitud completa (véase el Ejemplo 1). La unión de anticuerpos contra AXL y de los CAF-AXL a estas células se evaluó mediante citometría de flujo. Células HEK293 transfectadas transitoriamente se incubaron con diluciones en serie de los anticuerpos contra AXL o de los CAF-AXL (diluciones de factor 4; intervalo de concentración final 0,003-10 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron en 100 μl con anticuerpo secundario a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo de cabra contra la región F(ab')₂ de IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat. n.º 109-116-098) diluido a 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 μl de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

En la **Figura 4** se observa que la unión de los anticuerpos contra AXL a las células HEK293 que expresan el ECD de la AXL humana era similar a la unión de los CAF-AXL.

Ejemplo 6- Citotoxicidad in vitro inducida por conjugados de anticuerpo y fármaco específicos de AXL

Células LCLC-103H (cáncer de pulmón macrocítico humano) se cultivaron en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; n.º de cat. BE12-115F) complementado con suero bovino Cosmic al 10 % (vol/vol) termoinactivado (Perbio; n.º de cat. SH30087.03), L-glutamina 2 mM (Cambrex; n.º de cat. US17-905C), 50 UI/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (Cambrex; n.º de cat. DE17-603E). Células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) se cultivaron en DMEM (Cambrex; n.º de cat. BE12-709F) complementado con suero bovino Cosmic al 10 % (vol/vol) termoinactivado (Perbio; n.º de cat. SH30087.03), Piruvato sódico 1 mM (Cambrex; n.º de cat. BE13-115E), L-glutamina 2 mM

(Cambrex; n.º de cat. US17-905C), MEM (medio esencial mínimo) con NEAA (aminoácidos no esenciales) 100 µM (Invitrogen; n.º de cat. 11140), 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Cambrex; n.º de cat. DE17-603E). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol). Células LCLC-103H y MDA-MB-231 se cultivaron hasta llegar casi a la confluencia, después de lo cual las células se separaron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, n.º de cat. 352340) para obtener una suspensión de células sueltas. En cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 1x10³ células y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 5 horas a 37 °C, con CO₂ al 5 % para permitir su adherencia a la placa.

- 10 Se prepararon diluciones en serie (factor 4; concentraciones finales en el intervalo de 0,00015 a 10 µg/ml) de conjugados anticuerpo y fármaco contra AXL (CAF-AXL; véase el Ejemplo 1) en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Se usó la incubación de células con estaurosporina 1 µM (n.º S6942-200, Sigma) como referencia de destrucción del 100 % de las células tumorales. Las células no tratadas se utilizaron como referencia de destrucción del 0 % de las células tumorales. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C, con CO₂ al 5 %. A continuación, se
- 15 añadió reactivo CellTiter-Glo (Promega; n.º de cat. G7571) a los pocillos (20 µl por pocillo) y las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Posteriormente, se transfirieron 180 µl por pocillo a placas Optiplate™ blancas de 96 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA; n.º de cat. 6005299), que se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, la luminiscencia se midió en un lector multiplacas EnVision (Envision, Perkin Elmer).

- 20 Los CAF-AXL, IgG1-AXL-148-vcDuo3, IgG1-AXL-183-vcDuo3 e IgG1-AXL-726-vcDuo3 indujeron citotoxicidad en células LCLC-103H, con valores de Cl₅₀ entre 0,01 y 0,06 µg/ml, como se muestra en la **Figura 5A**. De manera similar, en la **Figura 5B** se muestra que estos CAF-AXL indujeron citotoxicidad de las células MDA-MB-231 con valores de Cl₅₀ entre 0,005 y 0,015 µg/ml.

25 *Ejemplo 7 - Variantes de VH y VL de anticuerpos que permiten la unión a AXL*

Las secuencias de proteínas de las regiones VH y VL del panel de anticuerpos contra AXL (descrito en el Ejemplo 1) se alinearon y se compararon para determinar la unión a AXL para identificar cambios críticos o permisivos de restos de aminoácidos en las regiones VH o VL. Por lo tanto, los anticuerpos con regiones VH o VL idénticas se agruparon y se compararon para determinar la unión a la AXL humana y las diferencias en las secuencias VL o VH, respectivamente. La unión a la AXL humana expresada transitoriamente por células HEK-293F, se evaluó en el ensayo de detección homogéneo específico de antígeno como se describe en el Ejemplo 1. La numeración de las posiciones de aminoácidos de las alineaciones realizadas en el presente ejemplo, se realizó basándose en las secuencias expuestas en la **Figura 6**, es decir, el primer aminoácido en la secuencia mostrada se numeró como posición "1", el

30 segundo como posición "2", etc.

En primer lugar, se agruparon anticuerpos con secuencias VL idénticas.

- 40 Se descubrió que IgG1-AXL-148 e IgG1-AXL-140 tenían una secuencia VL idéntica y mostraban diferencias de 1 aminoácido en la región CDR3 de HC (F por I en la posición de aminoácido 109; **Figura 6A**). Ambos anticuerpos se unieron a la AXL humana (Tabla 8), lo que indica que el aminoácido en la posición 109 no es esencial para la unión del anticuerpo, lo que supone que una mutación identificada en la región CDR2 (G por A en la posición del aminoácido 56) no compensa la pérdida de unión (**Figura 6A**).

- 45 Se descubrió que IgG1-AXL-726 e IgG1-AXL-187 tenían una secuencia VL idéntica y ambos anticuerpos se unían a la AXL humana (Tabla 8). Se permitieron dos cambios de restos de aminoácidos en la región CDR3 de HC (R por S en la posición 97 y A por T en la posición 105; **Figura 6B**) sin perder la unión, lo que supone que las mutaciones identificadas en la CDR1 (Y por H en la posición 32) y/o en las regiones estructurales (P3Q, V24I, Y25D, T86A y T117A) no compensan la pérdida de unión (**figura 6B**).

- 50 Se descubrió que IgG1-AXL-171, IgG1-AXL-172 e IgG1-AXL-181 tenían una secuencia VL idéntica y todos los anticuerpos se unían a la AXL humana (Tabla 8). Las regiones CDR3 de estos tres anticuerpos eran idénticas, pero se permitió un cambio de resto de aminoácido en la CDR1 HC (S por N en la posición 31) o en la región estructural (H por Q en la posición 82) sin perder la unión (**Figura 6C**).

- 55 Se descubrió que IgG1-AXL-613, IgG1-AXL-608-01, IgG1-AXL-610-01 e IgG1-AXL-620-06 tenían una secuencia VL idéntica y mostraban una diferencia de aminoácido en la región CDR3 de HC (N por D en la posición de aminoácido 101; **Figura 6D**). Todos los anticuerpos se unieron a la AXL humana (Tabla 8), lo que indica que el aminoácido en la posición 101 no es esencial, lo que supone que las mutaciones identificadas en la CDR2 de HC (V por A en la posición 58) y/o en las regiones estructurales (N35S, M37V, A61V, L70I, S88A) no compensan la pérdida de unión (**Figura 6D**).
- 60

A continuación, se agruparon anticuerpos con secuencias VH idénticas.

- 65 Se descubrió que IgG1-AXL-613 e IgG1-AXL-613-08 tenían una secuencia VH idéntica y mostraban cinco diferencias de aminoácidos en la región CDR3 de la LC (RSNWL por YGSSY en las posiciones 92 a 96; **Figura 6E**). Ambos anticuerpos se unieron a la AXL humana (Tabla 8), lo que indica que la variación de aminoácidos en las posiciones 92

a 96 está permitida y no afecta a la unión del anticuerpo, lo que supone que las mutaciones identificadas en la CDR1 (delección de la S en la posición 30), CDR2 (G51D) y/o en las regiones estructurales (G9A, S54N, R78S, Q100G, L104V) no compensan la pérdida de unión (**Figura 6E**).

5 **Tabla 8**

Anticuerpo	CE ₅₀ (µg/ml)	Unión máxima (Unidades arbitrarias)
IgG1-AXL-140	0,0026	2889
IgG1-AXL-148	0,0036	3499
IgG1-AXL-171	0,003	2575
IgG1-AXL-172	0,0055	5378
IgG1-AXL-181	0,008	3598
IgG1-AXL-187	0,0065	2563
IgG1-AXL-608-01	0,0035	3318
IgG1-AXL-610-01	0,0023	2947
IgG1-AXL-613	0,0072	5211
IgG1-AXL-613-08	0,0242	2209
IgG1-AXL-620-06	0,0034	4352
IgG1-AXL-726	0,0471	3154

Ejemplo 8 - Conjugación de MMAE con anticuerpos contra AXL y citotoxicidad in vitro inducida por anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE

10

Conjugación de MMAE con anticuerpos contra AXL

Los anticuerpos contra AXL se purificaron mediante cromatografía de proteína A de acuerdo con procedimientos convencionales y se conjugaron con vcMMAE. El fármaco enlazador vcMMAE se alquiló en las cisteínas de los anticuerpos reducidos de acuerdo con los procedimientos descritos en la bibliografía (véase Sun *et al.*, 2005; McDonagh *et al.*, 2006; y Alley *et al.*, 2008). La reacción se inactivó añadiendo un exceso de N-acetilcisteína. Cualquier fármaco no conjugado residual se eliminó por purificación y los conjugados finales de anticuerpo y fármaco contra AXL se formularon en PBS. Posteriormente se analizaron los conjugados de anticuerpo y fármaco contra AXL para determinar su concentración (mediante absorbancia a 280 nm), la relación fármaco-anticuerpo (DAR) mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco no conjugado (mediante cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (mediante cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxinas (mediante ensayo LAL (Lisado de Amebocitos de *Limulus*)). Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

25 **Tabla 9: Descripción general de las diferentes características de los conjugados de anticuerpo y fármaco.**

Ensayo	CAF, IgG1-AXL-									
	107	148	154-M103L	171	183-N52Q	511	613	726-M101L	733	IgG1-b12
Concentración (mg/ml)	7,18	9,63	6,57	3,69	6,71	5,77	6,17	7,37	7,71	1,58
DAR por HIC	3,97	3,96	3,71	3,65	3,92	3,87	4,23	4,12	4,08	4,00
% de anticuerpo no conjugado	4,68	5,58	6,13	7,11	8,68	8,35	5,13	4,99	3,74	1,89
% de agregación mediante SEC-HPLC	6,3	2,28	2,9	3,3	5,2	5,1	6,4	4,0	3,5	2,5
Endotoxina (UE/mg)	2,3	1,2	2,6	3,1	5,9	4,5	2,0	3,6	7,6	11,5

Cultivo celular

30 Células LCLC-103H (cáncer de pulmón macrocítico humano) y células A431 (DMSZ, Braunschweig, Alemania) se cultivaron en RPMI 1640 con L-Glutamina (Cambrex; n.º de cat. BE12-115F) complementado con suero bovino Cosmic al 10 % (vol/vol) termoinactivado (Perbio; n.º de cat. SH30087.03), L-glutamina 2 mM (Cambrex; n.º de cat. US17-905C), 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (Cambrex; n.º de cat. DE17-603E). Se cultivaron células MDA-MB231 en DMEM con alto contenido de glucosa y HEPES (Lonza n.º BE12-709F), Suero bovino donante con

hierro (Life Technologies n.º 10371-029), L-glutamina 2 mM (Lonza n.º BE17 -605E), Piruvato sódico 1 mM (Lonza n.º BE13-115E) y solución de aminoácidos no esenciales con MEM (medio esencial mínimo) (Life Technologies n.º 11140). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol). Se cultivaron células LCLC-103H, A431 y MDA-MB231 hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se separaron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, n.º de cat. 352340) para obtener una suspensión de células sueltas. En cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 1x10³ células y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente durante 5 horas a 37 °C, con CO₂ al 5 % para permitir su adherencia a la placa.

10 Ensayo de citotoxicidad

Se prepararon diluciones en serie (concentraciones finales en el intervalo de 0,00015 a 10 µg/ml) de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Se usó la incubación de células con estaurosporina 1 µM (n.º S6942-200, Sigma) como referencia de destrucción del 100 % de las células tumorales. Se usaron células no tratadas como referencia de crecimiento celular del 100 %. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C, con CO₂ al 5 %. A continuación, se añadió reactivo CellTiter-Glo (Promega; n.º de cat. G7571) a los pocillos (20 µl por pocillo) y las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Posteriormente, se transfirieron 180 µl por pocillo a placas Optiplate™ blancas de 96 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA; n.º de cat. 6005299), que se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, la luminiscencia se midió en un lector multiplacas EnVision (Envision, Perkin Elmer).

Los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE indujeron la muerte celular del 50 % en células LCLC-103H a concentraciones entre 0,004 y 0,219 µg/ml como se muestra en la **Tabla 10** y en la **Figura 7**.

25 De manera similar, los CAF-AXL indujeron citotoxicidad de manera eficaz en células A431 (**Tabla 11 y Figura 15A**) y en células MDA-MB231 (**Tabla 11 y Figura 15B**).

Tabla 10- Citotoxicidad de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en células LCLC-103H (valores de CE₅₀)

CAF	CE ₅₀ (µg/ml)
IgG1-AXL-613-vcMMAE	0,004
IgG1-AXL-148-vcMMAE	0,012
IgG1-AXL-171-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE	0,018
IgG1-AXL-107-vcMMAE	0,022
IgG1-AXL-511-vcMMAE	0,032
IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE	0,044
IgG1-AXL-183-N52Q-VCMAE	0,113
IgG1-AXL-733-vcMMAE	0,219

Tabla 11. Citotoxicidad de anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE en células A431 y MDA-MB-231 (valores de CE₅₀).

CAF	CE ₅₀ (µg/ml)			
	A431 (n = 3)		MDA-MB231 (n=2)	
	Media	d.e.	Media	d.e.
IgG1-AXL-107-vcMMAE*	0,154	0,066	0,037	0,005
IgG1-AXL-148-vcMMAE	0,070	0,013	0,012	0,004
IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE	0,719	0,091	0,396	0,195
IgG1-AXL-171-vcMMAE	0,206	0,074	0,035	0,006

(continuación)

CAF	CE ₅₀ (µg/ml)			
	A431 (n = 3)		MDA-MB231 (n=2)	
	Media	d.e.	Media	d.e.
IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE	1,157	0,160	0,139	0,028
IgG1-AXL-511-vcMMAE	0,093	0,020	0,052	0,003
IgG1-AXL-613-vcMMAE	0,109	0,078	0,005	0,001
IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE	0,270	0,157	0,022	0,002
IgG1-AXL-733-vcMMAE	1,253	0,228	0,881	0,182

En el presente documento *IgG1-AXL-107-vcMIVIAE también se denomina "HuMax-CAF-AXL"

Ejemplo 9 - Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor LCLC-103H en ratones SCID con anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE

La eficacia *in vivo* de los anticuerpos contra AXL conjugados con MMAE se determinó en tumores de xenoinjerto LCLC-103H subcutáneos (SC) establecidos en ratones SCID. En el costado derecho de ratones SCID hembra, se inyectaron por vía subcutánea 5×10^6 células tumorales LCLC-103H (carcinoma de pulmón macrocítico) (obtenidas en Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) en 200 µl de PBS. A partir de 14-21 días después de la inoculación de las células tumorales, cuando el tamaño promedio del tumor era $>100-200 \text{ mm}^3$ y se observó un claro crecimiento tumoral, se administró por vía intraperitoneal una única inyección con 1 mg/kg (20 µg/ratón) de anticuerpos IgG1-AXL-vcMMAE (como se describe en el Ejemplo complementario 1) o de control (IgG1-b12 no conjugado) (100 µl/ratón). El volumen del tumor se determinó al menos dos veces por semana. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de mediciones realizadas con un calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$.

El panel de anticuerpos contra AXL-vcMMAE mostró un amplio intervalo de actividad antitumoral en tumores subcutáneos, SC, LCLC-103H establecidos (**Figura 8**). Los clones IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE indujeron regresión tumoral, los clones AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE e IgG1-AXL-613-vcMMAE indujeron inhibición del crecimiento tumoral y los clones IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE mostraron inhibición nula o mínima del crecimiento tumoral.

El análisis estadístico del último día en que todos los grupos estaban intactos (día 30) mediante ANOVA unidireccional (prueba de comparaciones múltiples de Dunnett frente a IgG1-b12 de control) indicó una diferencia muy significativa ($p < 0,0001$) en el volumen tumoral entre IgG1-b12 frente a IgG1-AXL-733-vcMMAE, IgG1-AXL-107-vcMMAE e IgG1-AXL-148-vcMMAE. El tratamiento con estos clones condujo en algunos ratones de estos grupos a una reducción completa del tumor. El tratamiento con los clones IgG1-AXL-171-vcMMAE, IgG1-AXL-511-vcMMAE e IgG1-AXL-613-vcMMAE también mostró inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con IgG1-b12, pero las diferencias fueron menos pronunciadas ($p < 0,05$ a $p < 0,001$). El crecimiento tumoral de ratones tratados con los clones IgG1-AXL-154-M103L-vcMMAE, IgG1-AXL-183-N52Q-vcMMAE e IgG1-AXL-726-M101L-vcMMAE, no se vio afectado significativamente en comparación con el control IgG1-b12.

Se observó actividad antitumoral de los anticuerpos contra AXL-vcMMAE en diversos otros modelos tumorales *in vivo*. En dos modelos de xenoinjerto derivados de líneas celulares (A431; adenocarcinoma epidermoide y MDA-MB-231; cáncer de mama) los anticuerpos contra AXL-vcMMAE indujeron inhibición del crecimiento tumoral, y la regresión del tumor fue inducida por anticuerpos contra AXL-vcMMAE en dos modelos de xenoinjerto derivados de pacientes con cáncer de páncreas y cervicouterino.

Ejemplo 10 - Eficacia antitumoral de los CAF-AXL en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con cáncer de páncreas con expresión específica heterogénea

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE se determinó en el modelo PDX de cáncer de páncreas PAXF1657 (experimentos realizados por Oncotest, Freiburg, Alemania). En el costado izquierdo de ratones hembra NMRI nu/nu de 5-7 semanas de vida se implantó por vía subcutánea tejido tumoral de páncreas humano. La asignación al azar de los animales se realizó de la siguiente manera: animales portadores de un tumor con un volumen entre $50 - 250 \text{ mm}^3$, preferentemente $80 - 200 \text{ mm}^3$, se distribuyeron en 7 grupos experimentales (8 animales por grupo), teniendo en cuenta una mediana y una media comparables del volumen del tumor del grupo. El día de la asignación al azar (día 0), los 3 CAF se administraron por vía intravenosa (i.v.) a una dosis de 4 mg/kg o 2 mg/kg, y el grupo control recibió una dosis única de IgG1-b12 (4 mg/kg). Los

volúmenes tumorales (mm^3) se controlaron dos veces por semana y se calcularon a partir de mediciones realizadas con un calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$.

La tinción de los tumores PAXF1657 se realizó con técnicas de inmunohistoquímica convencionales. Resumiendo, tejidos congelados se fijaron con acetona durante 10 minutos y la peroxidasa endógena se agotó utilizando peroxidasa de hidrógeno. Posteriormente, las secciones de tejido se bloquearon con suero normal de ratón y la tinción se realizó incubando con $5 \mu\text{g/ml}$ un conjunto de 5 anticuerpos IgG1-AXL (IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137, IgG1-AXL-148, IgG1-AXL-183, IgG1-AXL-726). Después incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), la HRP se visualizó con amino-etil carbazol (AEC; que produce un color rojo). Cada portaobjetos se tiñó con hematoxilina (azul) de contraste para identificar los núcleos y se cubrió con glicerina. Los cortes de tejido inmunoteñido se digitalizaron en un microscopio Zeiss manual (AxioSkop) con aumentos de 10x y 40x.

En la **Figura 9** se muestra la expresión heterogénea de AXL en tumores PAXF1657. Mientras que en algunas células tumorales se observa una fuerte tinción de AXL, otras células no muestran tinción de AXL. En la fotografía en blanco y negro, la tinción de AXL aparece de color gris oscuro. La tinción con hematoxilina (núcleos) aparece de color gris claro.

En la **Figura 10A** se muestra que el tratamiento de los ratones con 2 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE, redujo significativamente el crecimiento de tumores PAXF1657 en comparación con el grupo de control. A una dosis de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE, se indujo la regresión tumoral de tumores PAXF1657. El día 14 después del tratamiento, el tamaño promedio del tumor de los ratones que se habían tratado con 2 mg/kg o 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-MMAE, IgG1-AXL-148-MMAE o IgG1-AXL-733-MMAE, fue significativamente más pequeño que el de los ratones que se habían tratado con una IgG de control de isotipo (IgG1-b12) ($p < 0,001$; prueba de comparación múltiple de Tukey).

El tratamiento de los ratones con IgG1-AXL-148 no conjugado no produjo actividad antitumoral en el modelo PAXF1657 (**Figura 10B**). Sin embargo, IgG1-AXL-148-vcMMAE conjugado, indujo actividad antitumoral dependiente de la dosis en este modelo (**Figura 10B**), lo que ilustra que la capacidad terapéutica de los CAF-AXL depende de la actividad citotóxica de MMAE.

Así mismo, el tratamiento de ratones con el CAF IgG1-b12-vcMMAE inespecífico, no mostró actividad antitumoral en el modelo PAXF1657 (**Figura 10C**), lo que ilustra que la capacidad terapéutica de los CAF-AXL también depende de la unión específica a la diana.

Ejemplo 11 - Anticuerpos contra AXL que se unen al dominio de Ig1

La especificidad de los anticuerpos contra AXL, IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613, por el dominio de AXL, se determinó usando un panel de mutantes de AXL quiméricos de ser humano-ratón. Para confirmar la expresión de hsAXL-mmECD se incluyó el anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón YW327.6S2 de reacción cruzada. Se incluyó IgG1-b12 como anticuerpo de control de isotipo. Se generaron cinco moléculas quiméricas de AXL diferentes y se expresaron en HEK293F como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, el dominio I similar a Ig (Ig1) humano, el dominio II similar a Ig (Ig2), el dominio I similar a FNIII (FN1) humano o el dominio II similar a FNIII (FN2) humano, se reemplazaron por sus homólogos murinos. La unión de $1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo contra AXL a las quimeras de AXL de ser humano-ratón se determinó mediante citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 2.

Todos los anticuerpos contra AXL mostraron unión a la AXL humana (**Figura 11A**), mientras que la unión se anuló cuando el ECD de la AXL humana se sustituyó por su homólogo murino (**Figura 11B**). Como se esperaba, el anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón YW327.6S2 de reacción cruzada, mostró unión a hsAXL-mmECD, lo que confirma la expresión adecuada de hsAXL-mmECD.

Los anticuerpos IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137, e IgG1-AXL-613 contra AXL, mostraron una unión fuertemente reducida a hsAXL-mmIg1 (**Figura 11C**), lo que ilustra el reconocimiento de un epítipo en el dominio de Ig1 de AXL. En línea con esto, la unión de IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 e IgG1-AXL-613 a hsAXL-mmIg2 (**Figura 11D**), a hsAXL-mmFN1 (**Figura 11E**) o a hsAXL-mmFN2 (**Figura 11F**) no se vio afectada. El anticuerpo monoclonal contra AXL de ser humano-ratón YW327.6S2 de reacción cruzada, mostró unión a todas las variantes quiméricas de AXL, lo que confirma la expresión adecuada de estas proteínas.

Ejemplo 12 - Los anticuerpos IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 contra AXL se unen al dominio de Ig1 pero no compiten con la unión de Gas6

Se analizó si la unión de los anticuerpos contra AXL, IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-107, IgG1-AXL-137 o IgG1-AXL-613 contra AXL, interfería con la unión del ligando Gas6 de AXL a AXL. Por lo tanto, la unión de Gas6 a células A431 que se habían preincubado con $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos contra AXL se analizó como se describe en el Ejemplo 2. La preincubación con anticuerpo YW327.6S2 contra AXL, que se describió que compite con Gas6 por la unión a AXL, IgG1-b12 (control de isotipo) o medio (control negativo) se incluyeron como controles.

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

En la **Figura 12** y en la **Tabla 12** se muestra que la unión de Gas6 a células A431 que se habían preincubado con anticuerpos IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 fue similar a la de los controles de IgG1-b12 y medio. Esto ilustra que la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 a AXL no interfiere con la unión de Gas6, como se muestra en el Ejemplo 2. La unión de Gas6 a las células A431 se redujo en gran medida en presencia de IgG1-AXL-061, IgG1-AXL-137 y el anticuerpo contra AXL de control YW327.6S2 en comparación con los controles IgG1-b12 y medio.

En experimentos en que las células A431 se preincubaron con Gas6, los valores de unión máximos de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 fueron comparables a los de la unión de los anticuerpos en ausencia de Gas6 (la unión máxima después de la preincubación con Gas6 fue de 91-108 % de la unión sin preincubación con Gas6) (**Tabla 12**). Los valores de CE₅₀ para la unión de IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 con o sin preincubación con Gas6 estaban en el mismo intervalo, o algo más altos después de la preincubación con Gas6 (**Tabla 12**), lo que ilustra que IgG1-AXL-107 e IgG1-AXL-613 no compiten con la unión de Gas6.

Similar al anticuerpo de control YW327.6S2, la unión de IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 a las células A431 se redujo considerablemente en presencia de Gas6 en comparación con la unión sin Gas6 (la unión máxima después de la preincubación con Gas6 fue del 40-43 % de la unión sin preincubación con Gas6; **Tabla 12**). Los valores de CE₅₀ de IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 no se pudieron determinar correctamente después de la preincubación con Gas6 (**Tabla 12**). Esto muestra que IgG1-AXL-061 e IgG1-AXL-137 compiten con Gas6 por la unión a AXL.

Estos datos demuestran que los anticuerpos que se unen al dominio AXL de Ig1 tienen un efecto diferencial sobre la unión de Gas6.

Tabla 12

Anticuerpo	Unión de anticuerpo a células A431			Unión de Gas6 a células A431	
	CE ₅₀ sin Gas6 CE ₅₀ (µg/ml) media (d. e.)	CE ₅₀ en presencia de Gas6 (µg/ml) media (d.e.)	Unión máxima en presencia de Gas6 (% de unión en ausencia de Gas6) media (d.e.)	CE ₅₀ en presencia de anticuerpos AXL (µg/ml) media (d.e.)	Unión máxima en presencia de anticuerpos contra AXL (% de unión en presencia de anticuerpo de control) media (d. e.)
IgG1-AXL-061	0,15 (n.a.)	n.a.	43 (28)	n.a.	22 (8)
IgG1-AXL-107	0,16 (0,17)	0,94 (1,18)	91 (5)	0,78 (0,54)	96 (8)
IgG1-AXL-137	0,11 (0,10)	n.a.	40 (18)	n.a.	36 (4)
IgG1-AXL-613	0,09 (0,09)	0,10 (0,10)	108 (22)	0,57 (0,36)	100 (11)
YW327.6S2	0,09 (0,09)	1,90 (1,04)*	41 (24)	5,53 (7,09)*	17 (10)
b12	n.a. ^a	n.a.	n.a.	0,40 (0,11)	100

^a n.a., no aplicable

* Los valores de CE₅₀ son menos precisos debido a la baja unión.

Ejemplo 13 - Eficacia antitumoral in vivo de los CAF-AXL en modelos de xenoinjerto con y sin producción autocrina (endógena) de Gas6

Producción de Gas6 de células tumorales A431 y LCLC-103H

Se analizó si las células A431 y las células LCLC-103H producen Gas6. Por lo tanto, las células se cultivaron en medio de cultivo completo durante 3 días. Los niveles de Gas6 en el sobrenadante se determinaron usando el ELISA Quantikine Human Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo usa la técnica ELISA tipo sándwich cuantitativa. Se ha recubierto previamente una microplaca con un Ab monoclonal específico para Gas6 humano. Los patrones y las muestras se pipeteen en los pocillos y cualquier Gas6 humano presente se une al Ab inmovilizado. Después de lavar cualquier sustancia no unida, se añade a los pocillos un Ab policlonal unido a enzima específico para Gas6 humano. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo enzimático no unido al Ab, se añade un sustrato a los pocillos y se revela el color en proporción a la cantidad de Gas6

humano unido en la etapa inicial. Se detiene el revelado del color y se mide la intensidad del color.

Se descubrió que el medio de cultivo celular condicionado con células A431 contenía 2576 ng/ml de Gas6, mientras que la concentración de Gas6 en medio acondicionado con células LCLC-103H fue más de 20 veces inferior (**Tabla 13**).

Tabla 13 - Producción de Gas6 en medio acondicionado con células tumorales.

Línea celular	Gas6 en sobrenadante (ng/ml)
LCLC-103H	126
A431	2576

10 Actividad antitumoral de los CAF-AXL *in vivo*

La actividad antitumoral *in vivo* de IgG1-AXL-061-vcMMAE (proteína de unión a Ig1), IgG1-AXL-107-vcMMAE (proteína de unión a Ig1), IgG1-AXL-137-vcMMAE (proteína de unión a Ig1), IgG1-AXL-148-vcMMAE (proteína de unión a Ig2), IgG1-AXL-183-vcMMAE (proteína de unión a FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (proteína de unión a FN2), se determinó en el modelo de tumor A431 (carcinoma epidermoide), que produce altos niveles de Gas6 y en el modelo de tumor LCLC-103H (carcinoma de pulmón macrocítico), que produce bajos niveles de Gas6.

La inducción del tumor se realizó mediante inyección subcutánea de 5×10^6 células tumorales A431 o LCLC-103H (ambas obtenidas en el Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) en 200 μ l de PBS en el costado derecho de ratones SCID hembra. El tratamiento comenzó 14-21 días después de la inoculación de las células tumorales, cuando el tamaño promedio del tumor era >100 -200 mm³ y se observó un claro crecimiento tumoral. Los ratones recibieron una única inyección o un total de 4 inyecciones intraperitoneales cada quince días de los CAF IgG1-AXL-vcMMAE o anticuerpo de control (IgG1-b12 no conjugado), según se indique. El volumen del tumor se determinó al menos dos veces por semana. Los volúmenes tumorales (mm³) se calcularon a partir de mediciones realizadas con un calibrador (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$.

En la **Figura 13A** se muestra que el tratamiento de los ratones con 3 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE e IgG1-AXL-733-vcMMAE, indujo la inhibición del crecimiento de los tumores A431.

En la **Figura 13B** se muestra que el tratamiento de los ratones con 3 mg/kg de IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE (proteína de unión a FN1) e IgG1-AXL-726-vcMMAE (proteína de unión a FN2), indujo la inhibición del crecimiento de los tumores A431. Por el contrario, los clones IgG1-AXL-061-vcMMAE y IgG1-AXL-137-vcMMAE no mostraron actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto A431.

En la **Figura 14A** se muestra que el tratamiento de los ratones con 3 mg/kg de IgG1-AXL-061-vcMMAE, IgG1-AXL-137-vcMMAE, IgG1-AXL-148-vcMMAE, IgG1-AXL-183-vcMMAE e IgG1-AXL-726-vcMMAE, indujo la regresión tumoral en el modelo de xenoinjerto LCLC-103H. De manera similar, el tratamiento de los ratones con 1 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE o con 1 mg/kg de IgG1-AXL-613-vcMMAE, indujo la regresión de tumores LCLC-103H (**Figura 14B**).

En resumen, todos los CAF-AXL mostraron actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto LCLC-103H que produce niveles bajos de Gas6. En el modelo de xenoinjerto A431, que produce niveles altos de Gas6, la actividad antitumoral solo se observó para aquellos CAF-AXL que no competían con el ligando Gas6 de AXL.

45 Ejemplo 14-Expresión de AXL en diferentes indicios tumorales

La expresión de AXL se evaluó en micromatrices de tejido tumoral (TMA, *tissue micro arrays*) recién cortado, incluido en parafina y fijado con formol (FFPE, *paraffin embedded and formalin fixated*), que comprende núcleos de tejido de pacientes con cáncer tiroideo, esofágico, de ovario, pancreático, de pulmón, de mama, cervicouterino o de endometrio, o melanoma maligno. Las TMA se obtuvieron en US BioMax.

Los portaobjetos con matrices de tejido tumoral FFPE se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígenos (pH 6) y la peroxidasa endógena se agotó mediante incubación con H₂O₂ al 0,1 % en tampón citrato/fosfato. Para detectar la expresión de AXL, las TMA se incubaron con anticuerpo de conejo contra AXL (Santa Cruz, n.º de cat.: sc-20741) a una concentración de 1 μ g/ml durante 60 min (temperatura ambiente (TA)). Para identificar las células (tumorales) de origen epitelial, las TMA se incubaron con anticuerpo de conejo contra citoqueratina (Abcam, cat. Nr. ab9377) a una dilución de 1:50 durante 60 min (TA). Después de una etapa de lavado, las TMA se incubaron con polímero de dextrano y anticuerpo contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (ImmunoLogic, n.º de cat.: DPVR55HRP) para detectar la unión de anticuerpos contra AXL de conejo y contra citoqueratina de conejo. Por último, la unión del polímero de dextrano y anticuerpo contra IgG de conejo se visualizó con di-amino-benzadina (DAB; color

marrón; DAKO, n.º de cat: K346811). En la TMA con núcleos de tejido de melanoma maligno, la unión del polímero de dextrano y anticuerpo contra IgG de conejo se visualizó con amino-etil carbazol (AEC; color rojo; Vector, SK4200). Los núcleos de las TMA se visualizaron con hematoxilina (color azul).

- 5 Las TMA inmunoteñidas con AXL y citoqueratina se digitalizaron con un escáner de portaobjetos Aperio a un aumento de 20x y la inmunotinción se cuantificó con un programa informático de análisis de imágenes tisulares (Definiens Tissue Studio software, versión 3.6.1), utilizando un algoritmo basado en células. El algoritmo se diseñó para identificar y cuantificar el porcentaje de células positivas a AXL o a citoqueratina en las biopsias (intervalo 0 - 100 %) y para
10 cuantificar la intensidad de tinción de AXL en las células tumorales positivas a AXL (densidad óptica (DO); intervalo 0-3) en cada núcleo tumoral. Las células tumorales se puntuaron como positivas a AXL, cuando la DO de AXL era al menos de 0,1. El porcentaje de células tumorales positivas a AXL por núcleo tumoral (intervalo 0 - 100 %) se calculó dividiendo el número total de células positivas a AXL entre el número total de células positivas a citoqueratina en núcleos tumorales secuenciales. La intensidad promedio de tinción (DO) de AXL en cada núcleo tumoral se calculó dividiendo la suma de la DO de AXL de todas las células tumorales positivas a AXL entre el número de células
15 tumorales positivas a AXL.

La matriz tumoral de los pacientes con melanoma maligno se puntuó manualmente. La intensidad de la tinción de AXL se puntuó como débil (1+), moderada (2+) o fuerte (3+) y el porcentaje de células de melanoma positivas a AXL se puntuó en intervalos del 10 % (intervalo de 0 - 100 %).

- 20 En la **Figura 16** se proporciona una representación gráfica de la expresión de AXL en núcleos tumorales de cáncer tiroideo, esofágico, de ovario, de mama, de pulmón, pancreático, cervicouterino y de endometrio. En la **Tabla 14** se muestra el porcentaje de núcleos tumorales que mostraron expresión de AXL en más del 10 % de las células tumorales, para cada indicio. En la **Figura 17** se muestra un ejemplo representativo de un núcleo de tejido
25 inmunoteñido con respecto a AXL, para cada indicio. Las figuras ilustran la expresión heterogénea de AXL en el tejido tumoral.

Tabla 14

Indicacio tumoral	Subtipo	% de núcleos tumorales (pacientes) con >10 % de células tumorales positivas a AXL
Cáncer de esófago	Adenocarcinoma (n=19)	73
	Carcinoma epidermoide (n=60)	55
Cáncer de ovario	Todos los subtipos (n=52)	90
Cáncer pancreático	Todos los subtipos (n=58)	60
Cáncer de pulmón (NSCLC)	Carcinoma epidermoide SSC (n=52)	63
	Adenocarcinoma (n=48)	67
Cáncer de pulmón (SCLC)	SCLC (n=5)	60
Cáncer tiroideo	Todos los subtipos (n=48)	92
Cáncer de útero	Todos los subtipos (n=60)	88
Cáncer de mama	TNBC (n=54)	24
Cáncer cervicouterino	Todos los subtipos (n=54)	93
Melanoma	Melanoma maligno (n=67)	6

- 30 Abreviaturas utilizadas: NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico; SLCL, cáncer de pulmón microcítico; TNBC, cáncer de mama triple negativo

Ejemplo 15-Los anticuerpos contra AXL se unen específicamente a AXL pero no a otros miembros de la familia de receptores TAM.

- 35 Expresión de AXL, MER y TIRO3 humanas en células HEK-293F

Para la expresión de diversas proteínas de longitud completa se generaron las siguientes construcciones con optimización de codones: AXL humana (*Homo sapiens*) (n.º de registro de Genbank NP_068713.2), MER humana (n.º de registro de Genbank EAW52096.1) y TIRO3 humana (n.º de registro de Genbank Q.06418.1). Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia óptima de Kozak (GCCGCCACC) (Kozak *et al.*, 1999). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.3 (Invitrogen)

Se obtuvieron células Freestyle™ 293-F (un subclon de HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y al medio Freestyle químicamente definido, (HEK-293F)) en Invitrogen y se transfectaron con los plásmidos de expresión utilizando 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cultivaron durante 24-48 horas.

Estudio de unión de anticuerpos contra AXL a AXL humana, a MER humana o a TIRO3 humana

Las células HEK-293F transfectadas transitoriamente con construcciones de expresión para AXL, MER o TIRO3 humana de longitud completa, se evaluaron para detectar la unión de anticuerpos HuMab-AXL mediante citometría de flujo. Las células HEK-293F transfectadas se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (diluciones de factor 4; intervalo de concentración final 0,002-10 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar tres veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron con anticuerpo de cabra contra la región F(ab')₂ de IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) de *Rhodophyta* (R) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat. n.º 109-116-098) diluido a 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (volumen final de 100 µl). A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 µl de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences). La tinción con anticuerpo de ratón contra Mer humana (R&D Systems, cat. Mab8912) y con anticuerpo de ratón contra Tiro3 humana (Dtk) (R&D Systems, cat. MAB859) se incluyeron como controles de expresión, como anticuerpo de control de isotipo sin unión se incluyó IgG1-b12. Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

La **Figura 18A** muestra que los anticuerpos Humab-AXL mostraron una unión dependiente de la dosis a las células HEK293 que expresan AXL humana. Por el contrario, no se observó unión de anticuerpos HuMab-AXL a células que expresaban MER (**Figura 18B**) o TIRO3 (**Figura 18C**) o a células HEK293 no transfectadas (**Figura 18D**). La tinción con anticuerpos específicos contra MER y TIRO3 confirmó que las células transfectadas mostraban una expresión adecuada de MER (**Figura 18F**) o de TIRO3 (**Figura 18G**), respectivamente.

Ejemplo 16- Internalización de anticuerpos contra AXL unidos a la superficie celular

Internalización de HuMab-AXL unido a la superficie celular evaluada por citometría de flujo

La internalización de anticuerpos HuMab-AXL unidos a la superficie celular en células MDA-MB-231 y Calu-1 (línea celular de carcinoma de pulmón humano; ATCC, número de catálogo HTB-54) se evaluó mediante citometría de flujo. Se sembraron 50.000 células en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se dejaron fijar durante 6 horas a 37 °C. Las placas se incubaron a 4 °C durante 30 minutos antes de la incubación con diluciones en serie de anticuerpos contra AXL (intervalo de concentración final 0,0032-10 µg/ml) a 4 °C durante 1 hora. Posteriormente, el medio se sustituyó por medio de cultivo tisular sin anticuerpos y las células se incubaron durante toda la noche (16-18 horas) a 37 °C o a 4 °C. Posteriormente, las células se separaron con 40 µl de solución tibia de tripsina, se lavaron con PBS enfriado con hielo/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo de cabra contra la región F(ab')₂ de IgG humana conjugado con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; cat. N.º 109-116-098) diluido a 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (volumen final 100 µl), para detectar anticuerpos contra AXL en la superficie celular. Por último, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 120 µl de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences).

Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

En la **Figura 19** se muestra que, en lo que respecta a todos los anticuerpos HuMab contra AXL y en todas las concentraciones analizadas, se detectó más anticuerpo en la membrana plasmática de las células que se habían incubado a 4 °C después de la unión del anticuerpo, en comparación con las células que se habían incubado a 37 °C. Esto ilustra que, a 37 °C, los anticuerpos contra AXL se internalizan al unirse a la membrana plasmática.

Ensayo de internalización y degradación intracelular de Fab-TAMRA/QSY7

La internalización de los anticuerpos contra AXL se evaluó en el ensayo de internalización de Fab-TAMRA/QSY7. En este ensayo se utiliza una pareja de fluoróforo (TAMRA) e inactivador (QSY7). En estrecha proximidad, por ejemplo, al conjugarse con la misma proteína, la fluorescencia de TAMRA se inactiva con QSY7. En este ejemplo, fragmentos Fab de anticuerpo de cabra contra IgG humana (Jackson Immunoresearch) se conjugaron con TAMRA/QSY7 (Fab-

TAMRA/QSY7) como se describe (Ogawa *et al.*, Mol Pharm 2009;6(2):386-395) y el HuMab contra AXL (1,5 µg/ml) se preincubó con Fab-TAMRA/QSY7 (12 µg/ml; 30 min, 4 °C). El complejo se añadió posteriormente a células LCLC-103H y se incubó durante 24 h en la oscuridad, en condiciones de agitación (200 rpm, 37 °C). La internalización del complejo HuMab-Fab-TAMRA/QSY7 y la degradación intracelular en los endosomas y lisosomas provoca la disociación de TAMRA/QSY7, lo que produce la desactivación de TAMRA. La fluorescencia TAMRA de las células LCLC-103H que se habían incubado con anticuerpos contra AXL formando complejo con Fab-TAMRA/QSY7 se midió en un FACS Canto-II (BD Biosciences).

Como se muestra en la **Figura 20**, la intensidad de fluorescencia de las células LCLC-103H aumentó tras la incubación con el complejo AXL-anticuerpo-Fab-TAMRA/QSY7, en comparación con IgG1-b12-Fab-TAMRA/QSY7 o Fab-TAMRA/QSY7 solos. Esto ilustra que los anticuerpos contra AXL se internalizan al unirse a las células LCLC-103H.

Ejemplo 17: La resistencia al inhibidor de BRAF PLX4720 se asocia a una expresión regulada por aumento de la proteína Axl y una mayor sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE in vitro e in vivo

En un panel de líneas celulares de melanoma humano (CDX) establecido y de líneas celulares de melanoma de bajo pase derivadas de pacientes (PDX), los niveles de expresión de la proteína Axl se evaluaron en relación con su resistencia intrínseca o adquirida a la inhibición del crecimiento mediante el tratamiento con el inhibidor de BRAF, PLX4720, un análogo al inhibidor de BRAF, vemurafenib, clínicamente aprobado. Además, se evaluó la sensibilidad de las células de melanoma al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE *in vitro* e *in vivo*.

Cultivo celular

SKMEL147 se obtuvo en el Laboratorio de Reuven Agami en el Instituto del Cáncer de los Países Bajos. A875 se obtuvo en Thermo Fischer, COLO679 en Sigma, y las células SKMEL28 y A375 en la ATCC. Líneas celulares de melanoma se cultivaron en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin (todos de Gibco). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol).

Generación de líneas celulares resistentes a PLX4720

Se cultivaron líneas celulares sensibles a inhibidores de BRAF (SKMEL28 y A375) en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de BRAF, PLX4720 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE.UU., Compañía: Selleck Chemicals, Houston, TX, EE.UU., Número de catálogo: S1152), hasta 3 µM para establecer las correspondientes SKMEL28R y A375R resistentes a PLX4720. Todas las líneas celulares resistentes a los fármacos se cultivaron permanentemente en presencia de 3 µM de PLX4720.

Generación de líneas celulares de melanoma de bajo pase derivadas de pacientes (PDX)

La Junta de Ética Médica del hospital Antoni van Leeuwenhoek, Instituto del Cáncer de los Países Bajos, ha aprobado la recogida y uso de tejidos humanos. Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de experimentación animal del instituto y se realizaron de acuerdo con las normas y reglamentos aplicables. El material tumoral humano se obtuvo durante una intervención quirúrgica o tomando biopsias tumorales de pacientes con melanoma maligno utilizando una aguja de calibre 14. Se usaron fragmentos tumorales de ~5mm³ para la implantación subcutánea en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Szl, que se realizó con anestesia. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana con un calibrador. Antes de alcanzar un tamaño tumoral de 1000 mm³, los ratones se sacrificaron, se extirparon los tumores y se disociaron fragmentos tumorales en suspensiones de células sueltas, se colocaron en placas de 10 cm y se cultivaron como cultivos celulares primarios en DMEM + FBS al 10 % (Sigma) + 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin (todos de Gibco).

Análisis de transferencia Western

La expresión de Axl y de MITF se determinó mediante análisis de transferencia Western. Las proteínas del lisado celular se separaron en un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato sódico (SDS) al 4-12 % y se transfirieron a una membrana de PVDF que posteriormente se tiñó con un anticuerpo específico contra Axl (sc-1096 Santa Cruz) en BSA al 5 % en PBS-Tween, o a una membrana de nitrocelulosa teñida con MITF (ab12039 Abcam) en leche en polvo descremada al 5 % en PBS-Tween. Para controlar la carga de gel, se usaron anticuerpos contra vinculina o beta-actina.

Cuantificación de la expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares de melanoma

La expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se cuantificó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el análisis QIFIKIT (DAKO, n.º de cat K0078). Axl se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón ab89224 (Abcam, Cambridge, RU). Las células adherentes se separaron con tripsina y se pasaron a través de un filtro celular para obtener suspensiones de células sueltas. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 1.200 rpm, se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de

1x10⁶ células/ml. Las siguientes etapas se realizaron en hielo. Se sembraron 100 µl de las suspensiones de células sueltas (100.000 células por pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner Bio-One, n.º de cat. 650101). Las células se sedimentaron por centrifugación durante 3 minutos a 300xg y se resuspendieron en 50 µl de muestra de anticuerpo o de control de isotipo IgG1 de ratón (número de cat. QF2040741, número de lote MAL-10406, Pierce) a una concentración de 10 µg/ml. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS (PBS con BSA al 0,1 %). Se añadieron perlas de configuración y calibración a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las perlas en paralelo se lavaron dos veces más con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 50 µl de IgG de cabra contra ratón conjugada con FITC (1/50; DAKO, n.º de cat. K0078). El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células y las perlas se lavaron dos veces con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS. La inmunofluorescencia se midió en un FACS Calibur (BD Biosciences) registrando 10.000 acontecimientos dentro de la selección de las células viables. La intensidad de fluorescencia media de las perlas de calibración se usó para calcular la curva de calibración usando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Para cada línea celular, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas de AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó usando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpo contra AXL, basándose en la ecuación de la curva de calibración (interpolación de incógnitas de la curva patrón, usando el programa informático GraphPad).

Citotoxicidad *in vitro*

Las células se cultivaron hasta alcanzar casi la confluencia, después de lo cual las células se separaron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, n.º de cat. 352340) para obtener una suspensión de células sueltas. Las células se sembraron en placas en un formato de 96 pocillos utilizando las siguientes densidades de siembra: 2000 células/pocillo para líneas celulares establecidas, 4000 células/pocillo para líneas celulares derivadas de PDX. Se añadió IgG1-AXL-107-vcMMAE 4 horas después de la siembra. Se prepararon diluciones en serie (factor 10; concentraciones finales en el intervalo de 0,0001 a 10 µg/ml) de IgG1-AXL-107-vcMMAE en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Después de 5 días (para muestras CD) o de 8 días (muestras PDX) de incubación a 37 °C, con CO₂ al 5 %, se añadió reactivo CellTiter-Glo (Promega; n.º de cat. G7571) a los pocillos y el ensayo de viabilidad celular luminiscente (Promega, Madison, WI) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia se midió con el lector de microplacas Infinite M200 (Tecan) y la viabilidad se calculó del siguiente modo: % de viabilidad = (luminiscencia de la muestra de interés - luminiscencia de PAO)/(luminiscencia promedio del vehículo de control tratado - luminiscencia de PAO), representando PAO 5 µM de óxido de fenilarsina para la destrucción celular del 100 %.

Modelo de xenoinjerto de melanoma SKMEL147

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de melanoma subcutáneo SKMEL147 en ratones NMRI atímicos. Los ratones recibieron una inyección subcutánea en el costado izquierdo de 2,5x10⁵ células de melanoma SKMEL147, que expresan altos niveles de Axl (véase la Figura 21 y la Tabla 15), que se resuspendieron a 1:1 en matrigel en un volumen total de 100 µl. Los tumores se midieron tres veces por semana con un calibrador, y cuando los tumores alcanzaron 100 mm³ los animales se asignaron al azar en los siguientes grupos de tratamiento: IgG1-b12 (4 mg/kg), IgG1-b12-vcMMAE (4 mg/kg), IgG1-107 (4 mg/kg), IgG1-107-vcMMAE (2 mg/kg) e IgG1-107-vcMMAE (4 mg/kg).

El día 12 y 19 después de la inyección de células tumorales (día 1 y día 8 de la asignación al azar) se inyectaron los compuestos de ensayo en la vena de la cola de los animales a un volumen total de 100 µl. Los animales se sacrificaron cuando el tamaño del tumor superó los 1.000 mm³.

Tratamiento de una población mixta de células SKMEL28 de tipo natural y de células SKMEL28 resistentes a PLX4720 con CAF-AXL, con inhibidor de BRAF y/o con inhibidor de MEK.

Células SKMEL28 de tipo natural y células SKMEL28 resistentes a PLX4720 (SKMEL28-R), se transfectaron con vectores de expresión de los fluoróforos de mCherry (color rojo) o de GFP (color verde), respectivamente. Posteriormente, las células se sembraron a una proporción de 1:1, con 50.000 células de cada línea celular en una placa de 6 pocillos (en total 100.000 células/pocillo). Después de 3 horas, se añadieron los siguientes compuestos a los pocillos: IgG1-AXL-107-vcMMAE (1 µg/ml), IgG1-b12-MMAE (1 µg/ml; CAF de control de isotipo), PLX4720 (10 µM; inhibidor de BRAF), dabrafenib (1 µM; inhibidor de BRAF), y/o trametinib (0,1 µM; inhibidor de MEK). Después de 4 días, las células se separaron con tripsina, se lavaron una vez en PBS + BSA al 1 % y se analizaron por citometría de flujo.

Inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión de AXL en tejidos enteros (WT, *whole tissues*) recién cortados, incluidos en parafina y fijados con formol (FFPE) con melanoma maligno. La tinción se realizó manualmente en soportes para portaobjetos Sequenza (Ted Pella Inc., Redding, CA, EE.UU.; n.º de cat. 36105).

Antes de la tinción, los portaobjetos con tejido FFPE se desparafinaron en xileno al 100 % (Sigma-Aldrich, n.º de cat. 16446; tres veces, 5 min.) y se deshidrataron en etanol al 96 % (Sigma Aldrich, n.º cat. 32294; dos veces, 5 min.) a TA. Tras ello, se realizó la recuperación de antígenos. Los portaobjetos de IHQ (inmunohistoquímica) se incubaron en tampón citrato (pH6; DAKO; cat. n.º S2369) durante 5 min. y la peroxidasa endógena se bloqueó en tampón de citrato/fosfato (ácido cítrico 0,43 M, Na₂HPO₄·2H₂O 0,35 M; pH5,8) a TA durante 15 minutos. Los portaobjetos se incubaron en suero humano normal al 10 % (CLB/Sanquin, cat. n.º K1146) en PBS, antes de la incubación con anticuerpos primarios. La expresión de Axl se determinó incubando con 3 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo contra Axl humana H-124 en PBS complementado con suero humano normal al 2 % a TA durante 60 minutos. Los portaobjetos se lavaron en PBS complementado con Tween-20 al 0,1 % (dos veces, 3 min.) y la unión de los anticuerpos de conejo específicos de Axl se detectó con anticuerpo policlonal de IgG de conejo conjugado con HRP de Bright Vision no diluido. La HRP se visualizó con el cromóforo 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (color rojo; Sigma, cat. n.º A6926-100TAB); los núcleos se tificaron con hematoxilina de contraste (DAKO, cat. n.º S3309). Un anatomopatólogo titulado analizó los portaobjetos en el Instituto Oncológico de los Países Bajos (NKI, Amsterdam, Países Bajos), y puntuó la intensidad y la localización de la tinción con Axl en cada muestra. En la **Figura 27** se muestran algunos ejemplos.

Resultados

Expresión de AXL:

La expresión de AXL se evaluó en un panel de líneas celulares de melanoma establecidas (**Tabla 15**) y de líneas de melanoma primario de bajo pase (PDX, **Tabla 16**). La expresión de AXL, determinada por transferencia Western (**Figura 21**), se correlacionó inversamente con la expresión de MITF en líneas celulares establecidas (**Figura 21A**) así como en muestras clínicas derivadas de pacientes (**Figura 21B**). En el panel de líneas celulares establecidas, la expresión de Axl se determinó también mediante citometría de flujo cuantitativa. En la **Figura 22** se muestra un ejemplo de una línea celular negativa y positiva a AXL. Los niveles de expresión de Axl (expresados como ABC) en todas las líneas celulares se enumeran en la **Tabla 15**, junto con el estado de mutación en BRAF de las líneas celulares.

Citotoxicidad del CAF-AXL *in vitro*:

A continuación, la sensibilidad de las líneas celulares de melanoma establecidas y del panel PDX a IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en ensayos de viabilidad. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de IgG1-AXL-107-vcMMAE (en el intervalo de 1×10^{-4} a 10 µg/ml) durante 5 días, tras lo cual se determinó la viabilidad celular. Los resultados se resumen en las **Tablas 15 y 16**, las curvas de respuesta a la dosis se muestran en las **Figuras 23 y 24**. La **Figura 23** muestra que las 4 líneas celulares que expresan AXL (SKMEL147, A875, A375R, SKMEL28R), tres de las cuales eran resistentes a PLX4720, son sensibles al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Las dos líneas celulares negativas a AXL, COLO679 y SKMEL28, no mostraron cambios en la viabilidad tras el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE. Se analizaron tres muestras PDX resistentes a PLX4720 en ensayos de viabilidad con IgG1-AXL-107-vcMMAE. La **Figura 24** muestra que los dos cultivos PDX de alta expresión de AXL, MO16 y MO19R, fueron sensibles al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE, mientras que el cultivo PDX M082 con baja expresión de AXL no mostró una respuesta diferente de la observada con el tratamiento de control IgG1-b12-vcMMAE.

Tabla 15. Características del panel de líneas celulares de melanoma.

Línea celular	Expresión de AXL (transferencia Western)	Expresión de AXL (FACS) Número de receptores (ABC)	BRAF	NRAS	Sensibilidad a PLX4720	Sensibilidad a HuMax-CAF-AXL
SKMEL147	+	34981	Tn	Q61R	resistente	Sensible
A875	+	37079	V600E	tipo natural	sensible	Sensible
COLO679	-	DLC	V600E	Tn	no analizado	Resistente
A375R	+	14228	V600E	Tn	resistente	Sensible
SKMEL28	-	DLC	V600E	Tn	sensible	Resistente
SKMEL28R	+	63809	V600E	Tn	resistente	Sensible

*BLQ = Por debajo del límite de cuantificación (<3300, valor de ABC (*antibody binding capacity*, capacidad de unión del anticuerpo) más bajo de las perlas de calibración)

Tabla 16. Características de los cultivos de melanoma derivados de pacientes

Nombre	Estado BRAF/NRAS	Expresión de AXL (Transferencia Western)	Expresión de AXL Número de receptores (ABC, FACS)	Sensibilidad a PLX4720	Sensibilidad a HuMax-CAF-AXL
M016	NRAS ^{Q61R}	+	13688	resistente	Sensible
M019R	BRAF ^{V600E}	++	25988	resistente	Sensible
M082	BRAF ^{V600E}	(baja)	3376	resistente	Insensible

Tratamiento con CAF-AXL *in vivo*:

En el modelo de xenoinjerto de melanoma SKMEL147, los ratones tratados con IgG1-b12, IgG1-b12-vcMMAE o IgG1-AXL-107, no mostraron inhibición del crecimiento tumoral. IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la inhibición del crecimiento tumoral a 2 mg/kg, y a una dosis de 4 mg/kg IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo una fuerte regresión tumoral, que duró hasta alrededor del día 50 (**Figura 25A**).

HuMax-CAF-AXL a una dosis de 4 mg/kg mostró así un intenso efecto antitumoral, pero los tumores empezaron a crecer de nuevo después del día 50. Cuatro ratones que mostraron rebrote tumoral tras la regresión tumoral inicial con 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE se volvieron a tratar con una dosis única de 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE el día 55, mientras que para la comparación se observaron otros dos ratones.

El tratamiento de nuevo con 4 mg/kg de IgG1-AXL-107-vcMMAE produjo una regresión tumoral en los cuatro ratones, mientras que los 2 ratones que se observaron, mostraron crecimiento tumoral (**Figura 25B**). Dos de los cuatro ratones que se volvieron a tratar mostraron una regresión tumoral que se mantuvo al menos hasta el día 80, mientras que se observó rebrote tumoral alrededor del día 70 en los otros dos ratones tratados de nuevo (**Figura 25B**).

Tratamientos combinados:

En la población mixta de células SKMEL28 tn y células SKMEL28 resistentes a PLX4720, en comparación con el control no tratado, el número total de células se redujo en un 74-62 % cuando las mezclas celulares se trataron con IgG1-AXL-107-vcMMAE, PLX4720, o dabrafenib (**Figura 26A**). Tratamiento de mezclas celulares con las combinaciones de IgG1-AXL-107-vcMMAE y PLX4720, IgG1-AXL-107-vcMMAE y dabrafenib, dabrafenib y trametinib o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE, indujo una reducción del 81-92 % del número total de células en comparación con las células no tratadas (**Figura 26A**).

Para evaluar si se erradicaron poblaciones celulares específicas, se determinó la relación de color verde (células SKMEL28-R positivas a GFP) y color rojo (células SKMEL28 positivas a mCherry). Como se esperaba, sin tratamiento y con tratamiento con IgG1-b12-vcMMAE no afectó a la relación GFP/mCherry, ya que el número total de células tampoco se vio afectado (**Figura 26B**). El tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE dio lugar a una relación GFP/mCherry muy reducida (**Figura 26B**), lo que indica la destrucción específica de las células SKMEL28-R. A la inversa, el tratamiento con los inhibidores de BRAF PLX4720 o dabrafenib aumentó la relación GFP/mCherry (**Figura 26B**), lo que indica la destrucción específica de las células SKMEL28. Las combinaciones de IgG1-AXL-107-vcMMAE y PLX4720, dabrafenib y trametinib o dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE, mostraron relaciones más cercanas a 1 (**Figura 26B**), lo que indica que ambos tipos celulares se destruyeron con una eficacia similar. El tratamiento con la combinación de IgG1-AXL-107-vcMMAE y dabrafenib dio lugar a una relación GFP/mCherry muy reducida (**Figura 26B**), lo que indica una destrucción más eficaz de las células SKMEL28-R a las concentraciones utilizadas.

Inmunohistoquímica:

En total se analizaron 45 muestras, de las cuales, 3 no contenían ningún material tumoral, por lo que se excluyeron del análisis. Además, se incluyeron 7 muestras emparejadas tratadas previamente (pre) y posteriormente (post) con vemurafenib de los mismos pacientes, y 1 muestra emparejada tratada previamente (pre) y posteriormente (post) con dabrafenib/trametinib.

En 41/42 muestras se detectó expresión de Axl en subconjuntos de la región del melanoma. La intensidad de la tinción difería según el tumor del paciente (**Tabla 17**).

Por otro lado, se observó una regulación por aumento de la expresión de Axl (medida por un anatomopatólogo que detectó un aumento de intensidad de tinción) en 4/7 muestras emparejadas antes (pre) y después (post) del tratamiento con vemurafenib (**Tabla 17**).

Tabla 17. Tinción de Axl en tejido tumoral de pacientes con melanoma.

Número de caso	Tratamiento	Pre-/post-tratamiento	Muestra emparejada	Células tumorales teñidas con Axl ^a	Comentarios
1	vemurafenib	post	ND	Parcialmente +	
2	vemurafenib	post	17	de débilmente + a +	
3	dabr/tram	post	ND	de + + a + + +	
4	vemurafenib	post	ND	Focalmente +	
5	vemurafenib	post	ND	Parcialmente débil +	
6	dabr/tram	post	40	ND	muy necrótico
7	dabr/tram	pre	16	Esporádica +	
8	vemurafenib	post	38	Esporádica +	las células débilmente positivas en el borde del tumor podrían ser el resultado de un artefacto de tinción
9	vemurafenib	post	ND	-	
10	vemurafenib	post	ND	Parcialmente débil +	
11	vemurafenib	post	ND	Débilmente +	muchos melanófagos +
12	vemurafenib	post	ND	Localmente débil +	algunos melanófagos +
13	vemurafenib	post	ND	de ++ a +++	
14	vemurafenib	post	39	Débilmente +	muchos melanófagos +
15	vemurafenib	post	24	Débilmente +	
16	dabr/tram	post	7	Débilmente +	
17	vemurafenib	pre	2	Parcialmente +	
18	vemurafenib	18 enfermedad estable post	ND	Débilmente +	
19	vemurafenib	post	ND	Localmente de + a ++	
20	vemurafenib	20 enfermedad estable post	ND	Débilmente +	
21	vemurafenib	post	ND	Débilmente +	
22	vemurafenib	post	ND	Parcialmente +	muchos melanófagos +
23	vemurafenib	post	ND	de + a + +	
24	vemurafenib	pre	15	Esporádica +	
25	vemurafenib	post	ND	Esporádica +	
26	vemurafenib	pre	44	Débilmente +	muchos melanófagos +
27	vemurafenib	post	ND	Parcialmente y débilmente +	
28	vemurafenib	28 enfermedad estable post	ND	Débilmente +	hay una cantidad limitada de células tumorales
29	vemurafenib	post	ND	Parcialmente y débilmente +	
30	vemurafenib	post	ND	Parcialmente +	
31	vemurafenib	post	ND	Parcialmente +	
32	vemurafenib	post	ND	+	pequeña cantidad de células tumorales/melanófagos con melanina
33	vemurafenib	post	ND	Localmente débil +	
34	vemurafenib	post	ND	de débilmente + a +	
35	vemurafenib	post	ND	Débilmente +	
36	vemurafenib	post	ND	débilmente +	muchos melanófagos +
37	vemurafenib	post	ND	Parcialmente débil +	
38	vemurafenib	pre	8	de débilmente + a +	

(continuación)

Número de caso	Tratamiento	Pre-/post-tratamiento	Muestra emparejada	Células tumorales teñidas con Axla	Comentarios
39	vemurafenib	pre	14	+	en los senos de los ganglios linfáticos hay células positivas. No se sabe con certeza si son células tumorales o macrófagos ya que estas células contienen un citoplasma bastante rico
40	dabr/tram	pre	6	ND	no se encuentran lesiones neoplásicas
41	vemurafenib	post	ND	ND	no se encuentran lesiones neoplásicas
42	vemurafenib	post	ND	Parcialmente +	las zonas parcialmente negativas podrían deberse a un artefacto de tinción
43	vemurafenib	post	ND	de débilmente + a +	
44	vemurafenib	post	26	de + a + +	
45	vemurafenib	post	ND	Parcialmente débil +	

^a -: negativa; intensidad de tinción positiva: débilmente + < + < ++ < + + +; zona de tinción positiva: esporádica < focal < local < parcial; ND: no disponible

5 Ejemplo 18 - Generación y caracterización de modelos de melanoma mutante BRAF derivados de PDX

Generación de cultivos celulares de melanoma de bajo pase derivados de pacientes (PDX)

La Junta de Ética Médica del hospital Antoni van Leeuwenhoek, Instituto del Cáncer de los Países Bajos, ha aprobado la recogida y uso de tejidos humanos. Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de experimentación animal del instituto y se realizaron de acuerdo con las normas y reglamentos aplicables. El material tumoral humano se obtuvo durante una intervención quirúrgica o tomando biopsias tumorales de pacientes con melanoma maligno utilizando una aguja de calibre 14. Se usaron fragmentos tumorales de ~5mm³ para la implantación subcutánea en ratones *NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Szl*, que se realizó con anestesia. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana con un calibrador. Antes de alcanzar un tamaño tumoral de 1000 mm³, los ratones se sacrificaron, se extirparon los tumores y se disociaron fragmentos tumorales en suspensiones de células sueltas, se colocaron en placas de 10 cm y se cultivaron como cultivos celulares primarios en DMEM + FBS al 10 % (Sigma) + 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina (todos de Gibco). El cultivo celular M019R se obtuvo de material tumoral de un paciente con melanoma que contenía una mutación *BRAF* V600E y que era intrínsecamente resistente a vemurafenib.

Cuantificación de la expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares de melanoma

La expresión de AXL en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se cuantificó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el análisis QIFIKIT (DAKO, n.º de cat K0078). Axl se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón ab89224 (Abcam, Cambridge, RU). Las células adherentes se separaron con tripsina y se pasaron a través de un filtro celular para obtener suspensiones de células sueltas. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 1.200 rpm, se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de 1x10⁶ células/ml. Las siguientes etapas se realizaron en hielo. Se sembraron 100 µl de las suspensiones de células sueltas (100.000 células por pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner Bio-One, n.º de cat. 650101). Las células se sedimentaron por centrifugación durante 3 minutos a 300xg y se resuspendieron en 50 µl de muestra de anticuerpo o de control de isotipo IgG1 de ratón (número de cat. QF2040741, número de lote MAL-10406, Pierce) a una concentración de 10 µg/ml. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS (PBS con BSA al 0,1 %). Se añadieron perlas de configuración y calibración a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las perlas en paralelo se lavaron dos veces más con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 50 µl de IgG de cabra contra ratón conjugada con FITC (1/50; DAKO, n.º de cat. K0078). El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células y las perlas se lavaron dos veces con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS. La inmunofluorescencia se midió en un FACS Calibur (BD Biosciences) registrando 10.000 acontecimientos dentro de la selección de las células viables. La intensidad de fluorescencia media de las perlas de calibración se usó para calcular la curva de calibración usando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Para cada línea celular, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas de AXL expresadas en la membrana plasmática, se calculó usando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpo contra AXL, basándose en la ecuación de la curva de calibración (interpolación de incógnitas de la curva patrón, usando el programa informático GraphPad).

Citotoxicidad *in vitro*

- Las células se cultivaron hasta alcanzar casi la confluencia, después de lo cual las células se separaron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, n.º de cat. 352340) para obtener una suspensión de células sueltas. Los cultivos celulares derivados de PDX se sembraron en placas de formato de 96 pocillos a una densidad de 4000 células/pocillo. Se añadió IgG1-AXL-107-vcMMAE, PLX4720 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE.UU.). n.º de cat: S1152), o trametinib (Selleck Chemicals; n.º de cat: S2673) 4 horas después de la siembra. Se prepararon diluciones en serie de los reactivos de ensayo en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Después de 8 días de incubación a 37 °C, con CO₂ al 5 %, se añadió reactivo CellTiter-Glo (Promega; n.º de cat. G7571) a los pocillos y el ensayo de viabilidad celular luminiscente (Promega, Madison, WI) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia se midió con el lector de microplacas Infinite M200 (Tecan) y la viabilidad se calculó del siguiente modo: % de viabilidad = (luminiscencia de la muestra de interés - luminiscencia de PAO)/(luminiscencia promedio del vehículo de control tratado - luminiscencia de PAO), representando PAO 5 µM de óxido de fenilarsina para la destrucción celular del 100 %.

Resultados

- Los cultivos celulares de melanoma derivados de PDX, M019R y M009R, se obtuvieron como se ha descrito anteriormente y se caracterizaron para determinar los niveles de expresión de Axl, el estado de la mutación de *BRAF* y *NRAS* y la sensibilidad *in vitro* a PLX4720, trametinib, o IgG1-AXL-107-vcMMAE. Los resultados se resumen en la Tabla 18. Los niveles de expresión de Axl en M009R fueron heterogéneos, lo que significa que sólo una subpoblación de células tenía niveles detectables de Axl, evaluados por citometría de flujo.

- Tabla 18. Características de los cultivos celulares de melanoma con mutación en *BRAF*

Línea celular	Expresión de Axl (FACS) Número de receptores (ABC)	BRAF	NRAS	sensibilidad al fármaco <i>in vitro</i>		
				sensibilidad a PLX4720 ^a	sensibilidad a trametinib ^a	sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE ^b
M019R	25988	V600E	tn	insensible	insensible	sensible
M009R	Heterogéneo (~3 % de células positivas a AXL)	V600E	tn	n.d.	n.d.	insensible

- Abreviaturas utilizadas: FACS, clasificación de células activadas por fluorescencia; ABC, capacidad de unión del anticuerpo; tn, tipo natural; n.d.; ^aLas líneas celulares insensibles no muestran muerte celular significativa a una concentración de 3 µM de PLX4720 o de 0,1 µM de trametinib
^bLas líneas celulares insensibles no muestran muerte celular significativa o muerte celular comparable a la de IgG1-b12-vcMMAE a una concentración de 1 µg/ml de IgG1-AXL-107-vcMMAE.

- Ejemplo 19 - Actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE solo y junto con BRAFi/MEKi en un modelo de melanoma mutante *BRAF* resistente (M019R) *in vivo*

Modelo de xenoinjerto M019R con mutación en *BRAF* derivado de un paciente con melanoma maligno

- La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de melanoma subcutáneo M019R en ratones NMRI atímicos. Los ratones recibieron una inyección subcutánea en el lado izquierdo de 2,5x10⁵ células de melanoma M019R, que se habían resuspendido a 1:1 en matrigel en un volumen total de 100 µl. Los tumores se midieron dos veces por semana con un calibrador, y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 100 mm³ el día 62 después de la inoculación de las células tumorales, los animales se asignaron al azar en los 3 grupos de tratamiento siguientes (7 u 8 ratones por grupo): IgG1-b12-vcMMAE ('CAF de control'; 4 mg/kg, i.v.), IgG1-AXL-107-vcMMAE (4 mg/kg, i.v.), y el inhibidor de BRAF dabrafenib (30 mg/kg, sonda oral) más el inhibidor de MEK trametinib (0,1 mg/kg, sonda oral).

- El día 0 y el día 7 después de la asignación al azar, los CAF se inyectaron en la vena de la cola de los animales a un volumen total de 100 µl. Desde el día de la asignación al azar, dabrafenib y trametinib se administraron por vía oral diariamente hasta la segunda asignación al azar. Los animales se sacrificaron cuando el tamaño del tumor superó los 1000 mm³.

- El día 30 después de la primera asignación al azar, los ratones tratados con la combinación de dabrafenib y trametinib se dividieron en tres grupos de tratamiento: dabrafenib y trametinib (n=3), IgG1-AXL-107-vcMMAE (n=5) o la combinación triple de dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE (n=5). El día 0 y el día 7 después de la asignación al azar, los CAF se inyectaron en la vena de la cola de los animales a un volumen total de 100 µl. Los

grupos que recibieron dabrafenib y trametinib se trataron diariamente desde el día de la asignación al azar hasta el final del estudio. Los animales se sacrificaron cuando el tamaño del tumor superó los 1000 mm³. La supervivencia se analizó con el programa informático Graphpad Prism utilizando un límite de tamaño tumoral de 900 mm³. Las diferencias de supervivencia entre grupos se analizaron con la prueba de Mantel-Cox.

Resultados

Los datos *in vitro* mostraron que el cultivo celular M019R derivado de PDX con mutación en BRAF, expresa Axl en la superficie celular (Ejemplo 17) y es resistente al inhibidor de BRAF PLX4720, en consonancia con la resistencia clínica a vemurafenib del paciente del que derivó este modelo. Por otro lado, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo eficazmente la destrucción de células M019R *in vitro* (Ejemplo 17).

Se trasplantaron células M019R en ratones atímicos y se evaluó la eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE. Los tratamientos de control con IgG1-b12-vcMMAE o dabrafenib y trametinib (en combinación) no produjeron una inhibición significativa del crecimiento tumoral en este modelo (Figura 28). Sin embargo, IgG1-AXL-107-vcMMAE (4 mg/kg) indujo la regresión tumoral, y no se observó crecimiento tumoral hasta 25 días después de la interrupción del tratamiento (día 39 después de la asignación al azar) (Figura 28). Usando una prueba de Mann-Whitney, realizada el día 33, se demostró que las diferencias en el tamaño del tumor entre el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE y IgG1-b12-vcMMAE ($p=0,0005$), y entre el tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE y dabrafenib/trametinib ($p<0,0001$) eran muy significativas.

Los ratones que recibieron el tratamiento de inicio con dabrafenib y trametinib y continuaron en tratamiento con dabrafenib y trametinib o se trataron solo con IgG1-AXL-107-vcMMAE, mostraron una supervivencia significativamente más corta en comparación con el tratamiento de la triple combinación de dabrafenib, trametinib e IgG1-AXL-107-vcMMAE ($p=0,0042$ y $p=0,0403$, respectivamente; Figura 28C). Por otro lado, los ratones tratados con IgG1-AXL-107-vcMMAE después del tratamiento inicial con dabrafenib y trametinib también mostraron una supervivencia significativamente más larga en comparación con los ratones que continuaron el tratamiento de dabrafenib y trametinib ($p=0,0462$; Figura 28C).

Ejemplo 20 - Actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE junto con BRAFi/MEKi en un modelo de melanoma con mutación en BRAF resistente (M009R) in vivo

Modelo de xenoinjerto M009R con mutación en BRAF derivado de un paciente con melanoma maligno

La actividad antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE se evaluó en el modelo de melanoma subcutáneo M009R en ratones NMRI atímicos. El cultivo celular derivado de M009R PDX se obtuvo como se describe en el Ejemplo 18 y derivó de material tumoral de un paciente con melanoma con una mutación V600E en BRAF que inicialmente mostró una respuesta a vemurafenib, pero adquirió resistencia a vemurafenib. Los ratones recibieron una inyección subcutánea en el costado izquierdo de $2,5 \times 10^5$ células de melanoma M009R, que se resuspendieron a 1:1 en matrigel en un volumen total de 100 μ l. Los tumores se midieron dos veces por semana con un calibrador, y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 100 mm³ el día 62 después de la inoculación de las células tumorales, los animales se distribuyeron al azar en los 4 grupos de tratamiento siguientes (7 u 8 ratones por grupo): IgG1-b12-vcMMAE ('CAF de control'; 4 mg/kg, i.v.), IgG1-AXL-107-vcMMAE (4 mg/kg, i.v.), el inhibidor de BRAF dabrafenib (30 mg/kg, sonda oral) más el inhibidor de MEK trametinib (0,1 mg/kg, sonda oral) más IgG1-b12-vcMMAE ('CAF de control'; 4 mg/kg, i.v.), y el dabrafenib (30 mg/kg, sonda oral) más trametinib (0,1 mg/kg, sonda oral) más IgG1-AXL-107-vcMMAE (4 mg/kg, i.v.).

El día 0 y el día 7 después de la asignación al azar, los CAF se inyectaron en la vena de la cola de los animales a un volumen total de 100 μ l. Desde el día de la asignación al azar, dabrafenib y trametinib se administraron por vía oral diariamente hasta el final del estudio. Los animales se sacrificaron cuando el tamaño del tumor superó los 1000 mm³.

Resultados

Las células M009R muestran una expresión heterogénea de Axl (Ejemplo 18), en consonancia con la resistencia clínica del paciente del que derivó este modelo. Por otro lado, IgG1-AXL-107-vcMMAE no indujo la destrucción de las células M009R *in vitro* a una concentración de 1 μ g/ml.

Se trasplantaron células M009R por vía subcutánea en ratones atímicos y se evaluó la eficacia antitumoral de IgG1-AXL-107-vcMMAE solo o junto con dabrafenib y trametinib. El tratamiento con el CAF de control (IgG1-b12-vcMMAE, 4 mg/kg) o IgG1-AXL-107-vcMMAE (4 mg/kg) no produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en este modelo (Figura 29A). El tratamiento con el CAF de control junto con dabrafenib más trametinib (en combinación) indujo la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que IgG1-AXL-107-vcMMAE junto con dabrafenib más trametinib indujo una regresión tumoral parcial (Figura 29A). Utilizando una prueba de Mann-Whitney realizada el día 14, se demostró que el tamaño promedio del tumor de los ratones tratados con la combinación de IgG1-AXL-107-vcMMAE con dabrafenib más trametinib, era significativamente más pequeño que el de los ratones tratados con el CAF de control ($p=0,003$), IgG1-AXL-107-vcMMAE ($p=0,0002$), CAF de control junto con dabrafenib más trametinib ($p=0,0034$; Figura

29B).

Ejemplo 21 - IgG1-AXL-107-vcMMAE induce citotoxicidad en líneas celulares tumorales resistentes a MEK con mutación en NRAS

Cultivo celular

Las líneas celulares SKMEL2, FM6 y BLM, portadoras de una mutación en el codón 61 de NRAS (Tabla 19), se obtuvieron en Thermo Fischer o ATCC. Líneas celulares de melanoma se cultivaron en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina (todos de Gibco). Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol).

Generación de una línea celular resistente a trametinib

La línea celular SKMEL2, sensible a inhibidor de MEK, se cultivó durante 2 a 3 meses en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de MEK, trametinib (Selleck Chemicals; n.º de cat: S2673) a concentraciones de hasta 0,1 µM, para establecer la correspondiente línea celular SKMEL2R resistente a trametinib.

Cuantificación de la expresión de Axl en la membrana plasmática de líneas celulares de melanoma

La expresión de Axl en la membrana plasmática de líneas celulares tumorales humanas se cuantificó con inmunofluorescencia indirecta utilizando el análisis QIFIKIT (DAKO, n.º de cat. K0078). Axl se detectó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón ab89224 (Abcam, Cambridge, RU). Las células adherentes se separaron con tripsina y se pasaron a través de un filtro celular para obtener suspensiones de células sueltas. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 1.200 rpm, se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de 1x10⁶ células/ml. Las siguientes etapas se realizaron en hielo. Se sembraron 100 µl de las suspensiones de células sueltas (100.000 células por pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner Bio-One, n.º de cat. 650101). Las células se sedimentaron por centrifugación durante 3 minutos a 300xg y se resuspendieron en 50 µl de muestra de anticuerpo o de control de isotipo IgG1 de ratón (número de cat. QF2040741, número de lote MAI-10406, Pierce) a una concentración de 10 µg/ml. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS (PBS con BSA al 0,1 %). Se añadieron perlas de configuración y calibración a la placa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células y las perlas en paralelo se lavaron dos veces más con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 50 µl de IgG de cabra contra ratón conjugada con FITC (1/50; DAKO, n.º de cat. K0078). El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células y las perlas se lavaron dos veces con 150 µl de tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS. La inmunofluorescencia se midió en un FACS Calibur (BD Biosciences) registrando 10.000 acontecimientos dentro de la selección de las células viables. La intensidad de fluorescencia media de las perlas de calibración se usó para calcular la curva de calibración usando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Para cada línea celular, la capacidad de unión del anticuerpo (ABC), una estimación del número de moléculas de Axl expresadas en la membrana plasmática, se calculó usando la intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con anticuerpo contra Axl, basándose en la ecuación de la curva de calibración (interpolación de incógnitas de la curva patrón, usando el programa informático GraphPad).

Citotoxicidad *in vitro*

Las células se cultivaron hasta alcanzar casi la confluencia, después de lo cual las células se separaron con tripsina, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular (BD Falcon, n.º de cat. 352340) para obtener una suspensión de células sueltas. Las células se sembraron en placas de formato de 96 pocillos a 2000 células/pocillo y 4 horas después de la siembra se añadió IgG1-AXL-107-vcMMAE. Se prepararon diluciones en serie (factor 10; concentraciones finales en el intervalo de 0,0001 a 10 µg/ml) de IgG1-AXL-107-vcMMAE en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Después de 5 días de incubación a 37 °C, con CO₂ al 5 %, se añadió reactivo CellTiter-Glo (Promega; n.º de cat. G7571) a los pocillos y el ensayo de viabilidad celular luminiscente (Promega, Madison, WI) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. La luminiscencia se midió con el lector de microplacas Infinite M200 (Tecan) y la viabilidad se calculó del siguiente modo: % de viabilidad = (luminiscencia de la muestra de interés - luminiscencia de PAO)/(luminiscencia promedio del vehículo de control tratado - luminiscencia de PAO), representando PAO el tratamiento con 5 µM de óxido de fenilarsina para la destrucción celular del 100 %.

Resultados

La expresión de Axl, determinada mediante transferencia Western o citometría de flujo, se observó en 2 de las 3 líneas celulares con mutación de NRAS (Tabla 19). De interés, una cuarta línea celular (SKMEL2R) derivó de la línea celular SKMEL2 mediante la exposición continua al inhibidor de MEK, trametinib, *in vitro*. La línea celular SKMEL2R, que adquirió resistencia a trametinib, mostró una fuerte expresión de Axl, mientras que las células SKMEL2 progenitoras, que eran sensibles a trametinib, no expresaban niveles detectables de Axl en la superficie celular (Tabla 19). La figura 30 muestra que IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo la destrucción específica de líneas celulares de melanoma con alta expresión de Axl, SKMEL2R, FM6 y BLM, mientras que las células SKMEL2, que no expresan Axl, fueron insensibles

al tratamiento con IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Por tanto, se observó expresión de Axl en líneas celulares de melanoma maligno con mutación en *NRAS*, incluida una línea celular que adquirió resistencia al inhibidor de MEK, trametinib. Por otro lado, IgG1-AXL-107-vcMMAE indujo citotoxicidad en líneas celulares de melanoma con mutación en *NRAS*, lo que demuestra que los niveles de expresión de Axl en estas células eran suficientes para permitir la inducción de citotoxicidad con IgG1-AXL-107-vcMMAE *in vitro*.

Tabla 19. Características de las líneas celulares de melanoma con mutación en *NRAS*

Línea celular	Expresión de Axl (transferencia Western)	Expresión de Axl (FACS) Número de receptores (ABC)	BRAF	NRAS	sensibilidad a PLX4720 ^a	sensibilidad a trametinib ^a	sensibilidad a IgG1-AXL-107-vcMMAE ^b
SKMEL2	-	DLC	tn	Q61R	insensible	sensible	insensible
SKMEL2R	+	70222	tn	Q61R	insensible	insensible	sensible
FM6	+	22361	tn	Q61K	insensible	n.e.	sensible
BLM	+	10792	tn	Q61R	insensible	n.e.	sensible

Abreviaturas utilizadas: FACS, clasificación de células activadas por fluorescencia; ABC, capacidad de unión del anticuerpo; BLQ, Por debajo del límite de cuantificación (<3300, valor de ABC más bajo de las perlas de calibración); tn, tipo natural; n.e., no evaluado

^aLas líneas celulares insensibles no muestran muerte celular significativa a una concentración de 3 µM de PLX4720 o de 0,1 µM de trametinib

^bLas líneas celulares insensibles no muestran muerte celular significativa o muerte celular comparable a la de IgG1-b12-vcMMAE a una concentración de 1 µg/ml de IgG1-AXL-107-vcMMAE.

Ejemplo 22 - Análisis IHQ de la expresión de Axl en tejidos de melanoma maligno avanzado

Inmunohistoquímica

La expresión de Axl se evaluó en secciones tisulares completas recién cortadas, incluidas en parafina y fijadas con formol (FFPE), obtenidas de pacientes con melanoma maligno avanzado que contenían mutaciones en el gen *NRAS* (n=10). La tinción se realizó manualmente en soportes para portaobjetos Sequenza (Ted Pella Inc., Redding, CA, EE.UU; n.º de cat. 36105).

Antes de la tinción, los portaobjetos con tejido FFPE se desparafinaron en xileno al 100 % (Sigma-Aldrich, n.º de cat. 16446; tres veces, 5 min.) y se deshidrataron en etanol al 96 % (Sigma Aldrich, n.º cat. 32294; dos veces, 5 min.) a TA. Tras ello, se realizó la recuperación de antígenos. Los portaobjetos de IHQ se incubaron en tampón citrato (pH6; DAKO; cat. n.º S2369) durante 5 min. y la peroxidasa endógena se bloqueó en tampón de citrato/fosfato (ácido cítrico 0,43 M, Na₂HPO₄·2H₂O 0,35 M; pH5,8) a TA durante 15 minutos. Los portaobjetos se incubaron en suero humano normal al 10 % (CLB/Sanquin, cat. n.º K1146) en PBS, antes de la incubación con anticuerpos primarios. La expresión de Axl se determinó incubando con 3 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo contra Axl humana H-124 en PBS complementado con suero humano normal al 2 % a TA durante 60 minutos. Los portaobjetos se lavaron en PBS complementado con Tween-20 al 0,1 % (dos veces, 3 min.) y la unión de los anticuerpos de conejo específicos de Axl se detectó con anticuerpo policlonal de IgG de conejo conjugado con HRP de Bright Vision no diluido. La HRP se visualizó con el cromóforo 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (color rojo; Sigma, cat. n.º A6926-100TAB); los núcleos se tiñeron con hematoxilina de contraste (DAKO, cat. n.º S3309). Un anatomopatólogo titulado analizó los portaobjetos de manera enmascarada, y puntuó el porcentaje de células tumorales positivas a Axl y la intensidad de la tinción (1+, 2+, 3+) de las células tumorales positivas a Ax en cada muestra. La puntuación H de cada tejido se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{puntuación H} = (\% \text{ de células } 1+ \times 1) + (\% \text{ de células } 2+ \times 2) + (\% \text{ de células } 3+ \times 3)$$

Resultados

La expresión de Axl se detectó en al menos un subconjunto de las células tumorales en 9 de 10 de los tejidos de melanoma avanzado con mutación en *NRAS* (Tabla 20; Figura 31). La intensidad de tinción y el porcentaje de células tumorales positivas a Axl diferían entre los pacientes.

Tabla 20. Expresión de Axl en un panel de muestras de tejido de melanoma avanzado con mutación en NRAS

Muestra	% de Axl 1+	% de Axl 2+	% de Axl 3+	Puntuación H de Axl
B2	70	10	10	120
B3	50	10	0	70
B4	0	0	0	0
B6	60	10	10	110
B7	30	0	10	60
B8	80	20	0	120
B9	60	0	0	60
B12	10	10	0	30
B15	60	10	10	110
B16	50	0	0	50

LISTA DE REFERENCIAS

- 5 Bahadoran *et al.*, J Clin Oncol; 1 de julio de 2013; 31(19): e324-e326
 Bansal *et al.*, Oncotarget. 20 de junio de 2015;6(17):15321-31
 Blakely *et al.*, Cancer Discov. Octubre de 2012;2(10):872-5
 Bleeker *et al.*, J Immunol. 1 de octubre de 2004;173(7):4699-707.
 10 Bollag *et al.*, Nat Rev Drug Discov nov de 2012;11(11):873-86
 Brand *et al.*, Clin Cancer Res. 1 de junio de 2015;21(11):2601-12
 Colombino *et al.*, J Clin Oncol 2012;30(20):2522-9
 Dahlman *et al.*, Cancer Discov. Septiembre de 2012;2(9):791-7. Epub 13 de julio de 2012.
 Debruyne *et al.*, Oncogene. 30 de noviembre de 2015. doi: 10.1038/ncr.2015.434
 15 Dufies *et al.*, Oncotarget. Noviembre de 2011;2(11):874-85
 Elkabets *et al.*, Cancer Cell. 13 de abril de 2015;27(4):533-46
 Greig *et al.*, Drugs, febrero de 2016;76(2):263-73.
 Herbst *et al.*, Expert Opin Investig Drugs. Febrero de 2007;16(2):239-49
 Hilger *et al.*, Int J Clin Pharmacol Ther. Dic de 2002;40(12):567-8.
 20 Hong *et al.*, Cancer Lett. 18 de septiembre de 2008;268(2):314-24.
 Hong *et al.*, Cancer Res. 1 de enero de 2013;73(1):331-40.
 Hong *et al.*, Clin Cancer Res. 15 de abril de 2012;18(8):2326-35.
 Huang *et al.*, Cancer Res. 15 de septiembre de 2010;70(18):7221-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0391
 Kim *et al.*, Curr Opin Mol Ther. Febrero de 2004;6(1):96-103.
 25 Kim *et al.*, Mol Oncol. Diciembre de 2013;7(6):1093-102.
 Konieczkowski *et al.*, 2014, Cancer Discov 4: 816-827.
 Li *et al.*, Oncogene. 7 de agosto de 2008;27(34):4702-11.
 Li *et al.*, Cancer Lett. 28 de enero de 2016;370(2):332-44.
 Liu *et al.*, Cancer Res. 1 de septiembre de 2009;69(17):6871-8
 30 Mahadevan *et al.*, Oncotarget. 10 de febrero de 2015;6(4):1954-66
 Mordant *et al.*, Mol Cancer Ther. Febrero de 2010;9(2):358-68
 Muller *et al.*, Nat Commun. 15 de diciembre de 2014;5:5712
 Park *et al.*, Leukemia. Diciembre de 2015;29(12):2382-9
 Pettazzoni *et al.*, Cancer Research 2015;75:1091-1101.
 35 Pollack *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. Noviembre de 1999;291(2):739-48)
 Prewett *et al.*, J Immunother Emphasis Tumor Immunol. Noviembre de 1996;19(6):419-27.
 Sirotnak *et al.*, Clin Cancer Res. Diciembre de 2000;6(12):4885-92.
 Talavera *et al.*, Cancer Res. 15 de julio de 2009;69(14):5851-9
 Tan *et al.*, Lung Cancer. Mayo de 2012; 76(2):177-82.
 40 Wilson *et al.*, Cancer Res. 15 de octubre de 2014;74(20):5878-90
 Wong *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. Abril de 2009;329(1):360-7.
 Xia *et al.*, Oncogene. 12 de septiembre de 2002;21(41):6255-63.
 Yang *et al.*, Crit Rev Oncol Hematol. Abril de 2001;38(1):17-23.
 Zhang *et al.*, Nat Genet. 1 de julio de 2012;44(8):852-60
 45 Zhou *et al.*, Oncogene. Mayo de 2016;35(21):2687-97
 WO 2014/174111; Pierre Fabre Medicament y Spirogen Sarl

- WO 09/062690; U3 Pharma
 WO 2010/130751; U3 Pharma
 WO 2014/093707; Stanford University
 EP 2 228 392 A1; Chugai
- 5 Yang *et al.*, EORTC meeting 2013, Poster 493 (2013a)
 Yang *et al.*, Int. J. Cancer: 132, E74-E84 (2013b)
 Paccez *et al.*, Int. J. Cancer: 134, 1024-1033 (2014) (Epub 4 de junio de 2013)
 Leconet *et al.*, Oncogene, 1-10 (2013)
 Linger *et al.*, Expert Opin. Ther. Targets, 14(10):1073-1090 (2010)
- 10 Li *et al.*, Oncogene, 28, 3442-3455 (2009)
 Ye *et al.*, Oncogene, 1-11 (2010)
 Alley *et al.*, Current Opinion in Chem. Bio., 4, 529-537 (2010)
 Iida *et al.*, Anticancer Research, 34:1821-1828 (2014)
 Tschuch *et al.*, AACR-EORTC meeting 2015, Poster A10 (2015)
- 15 King *et al.*, Cancer Res. 1 de diciembre de 2006;66(23):11100-5.
 Montagut *et al.*, J.Cancer Res. 15 de junio de 2008;68(12):4853-61.
 Sequist *et al.*, N Engl J Med. 6 de agosto de 2015;373(6):578-9
 Li *et al.*, Structure. Febrero de 2008;16(2):216-27
 Pedersen *et al.*, Cancer Res. 15 de enero de 2010;70(2):588-97.
- 20 Mishima *et al.*, Cancer Res. 15 de jul de 2001;61(14):5349-54
 Lynette *et al.*, J Chem Biol (2009) 2:131-151)
 Uitdehaag *et al.*, Br J Pharmacol. Junio de 2012; 166(3): 858-876.
 Tsai *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA. 26 de febrero de 2008;105(8): 3041-3046)
 Sullivan, Curr Opin Oncol marzo de 2016;28(2):185-91
- 25 Bollag *et al.* Nature, 2010, 467(7315), 596-599.
 Laquerre *et al.*, 2009, Conferencia Internacional de la EORTC. Abst B88.
 Stuart *et al.*, Cancer Res, 2012, 72(8 Suplemento): 3790
 Wilhelm *et al.*, Cancer Res, 2004, 64(19), 7099-7109
 Yamaguchi *et al.*, Int J Oncol, 2011, 39(1), 23-31.
- 30 Hoeflich KP, *et al.* Cancer Res. 2012, 72(1), 210-219.
 Huynh H, *et al.* Mol Cancer Therapy, 2007, 6 (1), 138-146
 J Pheneger, *et al.* 2006, Reunión científica anual del ACR. Abst 794.
 Iverson *et al.*, Cancer Res, 2009, 69(17), 6839-6847.
 Kim K, *et al.* Br J Haematol, 2010, 149(4), 537-549.
- 35 Sebolt-Leopold *et al.*, Nat Med, 1999, 5(7), 810-816.
 Tatake RJ, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1), 120-125.
 Aronov *et al.*, J Med Chem 2009, 52(20), 6362-6368.
 Ward *et al.*, J Med Chem 2015;58(II):4790-4801.
- 40 WO 2012/175691; INSERM
 WO 2012/175692; INSERM
 WO 2013/064685; PF Medicament
 WO 2013/090776; INSERM
 WO 2009/063965; Chugai Pharmaceuticals
- 45 WO 2010/131733
 Hfizi *et al. et al.*, 2006, FEBS Journal, 273; 5231-5244
 WO 2007/059782; Genmab A/S
 Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)
 Holt *et al.*, Trends Biotechnol. Noviembre de 2003;21(II):484-90
- 50 Revets *et al.*, Expert Opin Biol Ther. Enero de 2005;5(I):III-24
 Bird *et al.*, Science 242, 423-426 (1988)
 Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)
 Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)
 Lefranc MP. *et al.*, Nucleic Acids Research, 27 *et al.*, 209-212, 1999
- 55 Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
 Korshunov *et al.*, Clin Sci (Lond). Abril de 2012;122(8):361-8.
 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, cap. 15
 Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest. 5ª Edición - Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación NIH N.º 91-3242, páginas 662, 680, 689 (1991)
- 60 WO 2004/010957; Seattle Genetics, Inc.
 US 7.659.241; Seattle Genetics, Inc.
 Wu *et al.*, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)
- 65 WO 2011/131746; Genmab A/S
 WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech

- WO9850431; Genetech
 WO2011117329; Roche
 EP1870459; Amgen
 WO2009089004; Amgen
- 5 US 2010/00155133; Chugai
 WO 2010/129304; Oncomed
 WO2007/110205; EMD Serono
 WO 2010/015792; Regeneron
 WO 11/143545; Pfizer/Rinat
- 10 WO 2012/058768; Zymeworks/Merck
 WO 2011/028952; Xencor
 WO 2009/080254; Roche
 WO 2008/003116; F-Star
 US 7.262.028; Crucell/Merus
- 15 US 7.612.181; Abbott
 WO 2010/0226923; Unilever, Sanofi Aventis
 US 7.951.918; Biogen Idec
 CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
 WO 2012/025525; Roche
- 20 WO 2012/025530; Roche
 WO 2008/157379; Macrogenics
 WO 2010/080538; Macrogenics
 Goodman *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8ª Ed., Macmillan Publishing Co., 1990
- 25 Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993)
 US 5.194.594
 US 2005/0238649
 WO 2013/173391; Concoris Biosystems, Corp.
 Junghans *et al.*, en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds, Lippincott Raven
- 30 (1996))
 US 4.681.581
 US 4.735.210
 US 5.101.827
 US 5.102.990
- 35 US 5.648.471
 US 5.697.902
 US 4.766.106
 US 4.179.337
 US 4.495.285
- 40 US 4.609.546
 Hunter *et al.*, Nature 144, 945 (1962), David *et al.*, Biochemistry 13, 1014 (1974)
 Pain *et al.*, J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)
 Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)
 Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)
- 45 WO 2002/083180; Syngenta BV
 WO 2004/043493; Syngenta BV
 WO 2007/018431; Syngenta BV
 WO 2007/089149; Syngenta BV
 WO 2009/017394; Syngenta BV
- 50 WO 2010/62171; Syngenta BV
 US 6989452; Medarex
 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
 Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)
- 55 US 6.077. 835
 WO 00/70087
 Schakowski *et al.*, Mol Ther 3, 793-800 (2001)
 WO 00/46147
 Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
- 60 Wigler *et al.*, Cell 14, 725 (1978)
 Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)
 US 5.589.466
 US 5973972
 Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
- 65 Ausubel *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience Nueva York (1987)

- Grant *et al.*, Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)
 Lonberg, N. *et al.*, Nature 368, 856 859 (1994a)
 Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994b)
 Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995)
- 5 Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)
 Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992)
 Chen, J. *et al.*, International Immunology 5, 647 656 (1993)
 Tuaillon *et al.*, J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)
 Taylor, L. *et al.*, International Immunology 6, 579 591 (1994)
- 10 Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)
 US 5.545.806
 US 5569825
 US 5625126
 US 5633425
- 15 US 5789650
 US 5877397
 US 5661016
 US 5814318
 US 5874299
- 20 US 5770429
 US 5545807
 WO 98/024884
 WO 94/025585
 WO 93/001227
- 25 WO 92/022645
 WO 92/003918
 WO 01/009187
 Shieh, Neoplasia 2005
 Koorstra, Cancer Biol Ther 2009
- 30 Hector, Cancer Biol Ther 2010
 Sun, Ann Oncol 2003
 Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase
 "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro *et al.*, (eds.),
 páginas 624-652 (Mack Publishing Co., 1990)
- 35 Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto *et al.*, (eds.)
 (Chapman & Hall 1993)
 US 5.057.313
 US 6331175
 US 5635483
- 40 US 5780588
 Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584
 US5663149
 Pettit *et al.*, (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965
 Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volumen 45, resumen número 623,
 presentado el 28 de marzo de 2004 US 2005/0238649
- 45 US 7.498.298; Seattle Genetics, Inc.
 US 7.994.135; Seattle Genetics, Inc.
- WO 2005/081711; Seattle Genetics, Inc.
- 50 Kozak *et al.* (1999) Gene 234: 187-208
 EP 2 220 131; U3 Pharma
 WO 2011/159980; Genentech
 Barbas, CF. J Mol Biol. 5 de abril de 1993;230(3):812-23
 US 7.829.531; Seattle Genetics, Inc.
- 55 US 7.851.437; Seattle Genetics, Inc.
 WO 2013/173392; Concortis Biosystems, Corp.
 WO 2013/173393; Concortis Biosystems, Corp.
 Sun *et al.* (2005) Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290
 McDonagh *et al.*, (2006) Protein Eng. Design Sel. 19: 299-307
- 60 Alley *et al.*, (2008) Bioconjugate Chem. 19: 759-765

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) que comprende un anticuerpo que se une a la AXL humana y un agente citotóxico, para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto junto con uno o más inhibidores de la vía de la MAP cinasa (MAPK), seleccionado de un inhibidor de B-RAF (BRAF), un inhibidor de MEK y un inhibidor de ERK.
2. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de BRAF.
3. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el inhibidor de BRAF se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, PLX4720, GDC-0879, RAF265, SB590885, AZ628, AB-024, TAK-580, BAL-3833, BGB-283, opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través del inhibidor de BRAF.
4. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF.
5. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la mutación se encuentra en un resto de BRAF seleccionado de V600, L597 y K601, tal como V600.
6. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600K, V600D, L597R y K601E, tal como V600E.
7. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el melanoma no presenta una mutación en NRAS seleccionada del resto Q61, G12 y G13.
8. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el melanoma no presenta una mutación activadora en NRAS.
9. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de MEK.
10. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el inhibidor de MEK se selecciona de trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, refametinib, pimasetib, U0126-EtOH, PD184352, BIX 02189.
11. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde el melanoma presenta una mutación en NRAS, tal como en un resto de NRAS seleccionado de Q61, G12 y G13, tal como Q61.
12. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, tal como una mutación en NRAS seleccionada de Q61R, Q61K, Q61L, G12D, G12S, G12C, G12V, G13D y G13R.
13. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más inhibidores de la vía MAPK comprende o consiste en un inhibidor de ERK.
14. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el inhibidor de ERK se selecciona de LTT-462, ulixertinib, SCH772984 y VTX11E.
15. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con un inhibidor de BRAF y un inhibidor de MEK.
16. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde
 - (a) el inhibidor de BRAF se selecciona de vemurafenib, dabrafenib, encorafenib, sorafenib, GDC-0879, RAF265, SB590885, AZ628, AB-024, TAK-580, BAL-3833, BGB-283; y/o
 - (b) el inhibidor de MEK se selecciona de trametinib, cobimetinib, binimetinib, selumetinib, refametinib, pimasetib, U0126-EtOH, PD184352, BIX 02189.
17. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, junto con
 - (a) vemurafenib y trametinib;
 - (b) vemurafenib y cobimetinib;
 - (c) vemurafenib y binimetinib;
 - (d) vemurafenib y selumetinib;
 - (e) dabrafenib y trametinib;
 - (f) dabrafenib y cobimetinib;
 - (g) dabrafenib y binimetinib;
 - (h) dabrafenib y selumetinib;

- (i) encorafenib y trametinib;
 - (j) encorafenib y cobimetinib;
 - (k) encorafenib y binimetinib;
 - (l) encorafenib y selumetinib;
 - 5 (m) sorafenib y trametinib
 - (n) sorafenib y cobimetinib;
 - (o) sorafenib y binimetinib; o
 - (p) sorafenib y selumetinib,
- 10 opcionalmente, en donde el melanoma presenta una mutación en BRAF que permite la inhibición de la actividad cinasa del BRAF mutante a través del inhibidor de BRAF.
18. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, junto con vemurafenib y trametinib.
- 15 19. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, junto con dabrafenib y trametinib.
20. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde la mutación en BRAF se encuentra en un resto de BRAF seleccionado de V600, L597 y K601, tal como en V600.
- 20 21. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la mutación en BRAF se selecciona de V600E, V600K, V600D, L597R y K601E, tal como V600E.
22. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el melanoma no presenta una mutación en NRAS en un resto seleccionado de Q61, G12 y G13.
- 25 23. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el melanoma no presenta una mutación activadora en NRAS.
24. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el CAF y el uno o más inhibidores de la vía MAPK se administran de manera simultánea, por separado o de manera secuencial.
- 30 25. El CAF para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el melanoma tiene resistencia intrínseca o adquirida a uno o más inhibidores de la vía MAPK.
- 35 26. El CAF para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde el melanoma no es resistente al uno o más inhibidores.
27. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el CAF se administra cada 1 semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas o tres veces durante 4 semanas.
- 40 28. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el CAF se administra a una dosis de 0,02-30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,05-10 mg/kg.
29. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente citotóxico está enlazado al CAF con un enlazador.
- 45 30. El CAF para el uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el enlazador es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE.
- 50 31. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la unión máxima del anticuerpo a la AXL humana en presencia de Gas6 es de al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 %, tal como de 100 %, de unión en ausencia de Gas6, determinado mediante un ensayo de competencia, en donde la competencia entre dicho anticuerpo que se une a la AXL humana y dicho Gas6, se determina en células A431 preincubadas con Gas6 y sin Gas6.
- 55 32. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:
- 60 (a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente;
- (b) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente;
- 65 (c) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 114, 115 y 116,

- respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 117, DAS y 118, respectivamente;
- (d) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 53, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente;
- (e) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 51, 52 y 54, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 55, GAS y 56, respectivamente;
- (f) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente;
- (g) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 62, 63 y 64, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 65, GAS y 66, respectivamente;
- (h) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 70, GAS y 71, respectivamente;
- (i) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 73 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente;
- (j) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 72, 74 y 75, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 76, ATS y 77, respectivamente;
- (k) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 81, AAS y 82, respectivamente;
- (l) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 86, GAS y 87, respectivamente;
- (m) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 88, 89 y 90, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 91, GAS y 92, respectivamente;
- (n) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente;
- (o) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 98, 99 y 100, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 101, DAS y 102, respectivamente;
- (p) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 103, 104 y 105, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 106, GAS y 107, respectivamente;
- (q) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 110, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente;
- (r) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 108, 109 y 111, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente;
- (s) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 41, 42 y 43, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 44, AAS y 45, respectivamente;
- (t) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 94 y 95, respectivamente, y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 128, XAS, en donde X es D o G, y 129, respectivamente;
- (u) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 46, 119 y 120, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 49, AAS y 50, respectivamente;
- (v) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 123, 124 y 125, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 60, GAS y 61, respectivamente;
- (w) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 121, 109 y 122, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 112, AAS y 113, respectivamente; y
- (x) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 93, 126 y 127, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 96, GAS y 97, respectivamente.

33. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende

- (a) una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente, y
- (b) una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, 40 y 41, respectivamente.

34. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en:

- [illegible]

- (s) una región VH al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:32 y una región VL al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 33.

5 35. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH y una región VL seleccionada del grupo que consiste en;

- 10 (a) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 2;
 (b) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 6;
 (c) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 34 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 35;
 (d) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 9;
 (e) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 11;
 (f) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 16 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18;
 15 (g) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 26;
 (h) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 31 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 33;
 (i) una región VH que comprende la SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 4;
 (j) una región VH que comprende la SEQ ID NO:8 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 9;
 (k) una región VH que comprende la SEQ ID NO:12 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 13;
 20 (l) una región VH que comprende la SEQ ID NO:14 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 15;
 (m) una región VH que comprende la SEQ ID NO:17 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 18;
 (n) una región VH que comprende la SEQ ID NO:19 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 20;
 (o) una región VH que comprende la SEQ ID NO:21 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 22;
 (p) una región VH que comprende la SEQ ID NO:23 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 24;
 25 (q) una región VH que comprende la SEQ ID NO:27 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 28;
 (r) una región VH que comprende la SEQ ID NO:29 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 30; y
 (s) una región VH que comprende la SEQ ID NO:32 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 33.

30 36. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende la SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la SEQ ID NO: 2.

37. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende al menos una región de unión que comprende una región VH que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente; y una región VL que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 39, GAS y 40, respectivamente, el enlazador es mc-vc-PAB y el agente citotóxico es MMAE.

38. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a un epítipo en AXL en donde el epítipo es reconocido por cualquiera de los anticuerpos definidos en la reivindicación 35.

39. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig1 de la AXL humana, comprendiendo o requiriendo el epítipo uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones L121 a Q129 o T112 a Q124 de la AXL humana.

40. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio Ig2 de la AXL humana, comprendiendo o requiriendo el epítipo los aminoácidos correspondientes a la posición D170 o la combinación de D179 y uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones T182 a R190 de la AXL humana.

41. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio FN1 de la AXL humana, comprendiendo o requiriendo el epítipo los aminoácidos correspondientes a las posiciones Q272 a A287 o G297 a P301 de la AXL humana.

42. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en donde el anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio FN2 de la AXL humana, comprendiendo o requiriendo el epítipo los aminoácidos correspondientes a las posiciones A359, R386, y uno o más aminoácidos correspondientes a las posiciones Q436 a K439 de la AXL humana.

43. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

44. El CAF para el uso de la reivindicación 43, en donde el isotipo es IgG1, opcionalmente el alotipo IgG1m(f).

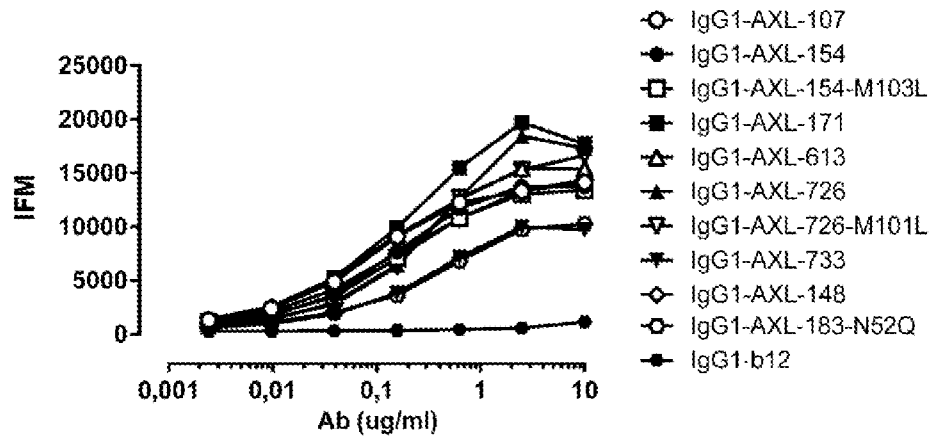
45. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es

un anticuerpo monoclonal de longitud completa, tal como un anticuerpo monoclonal IgG1, κ de longitud completa.

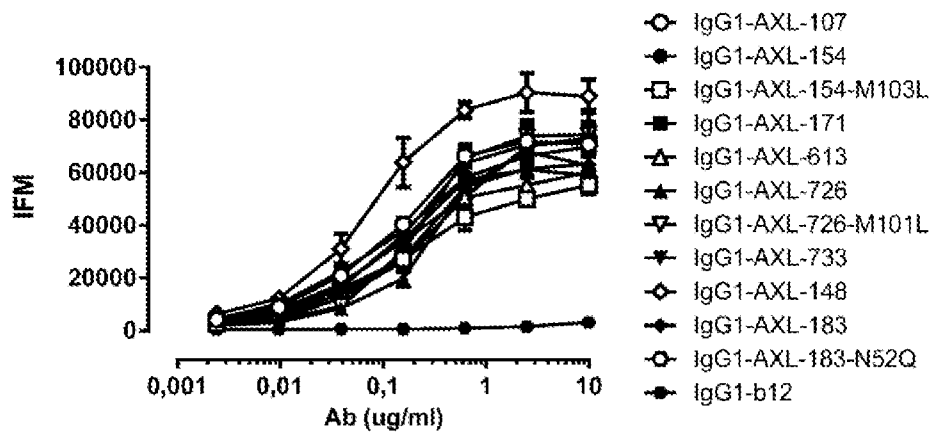
46. El CAF para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el CAF está comprendido en una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéutico aceptable.

Figura 1

A



B



C

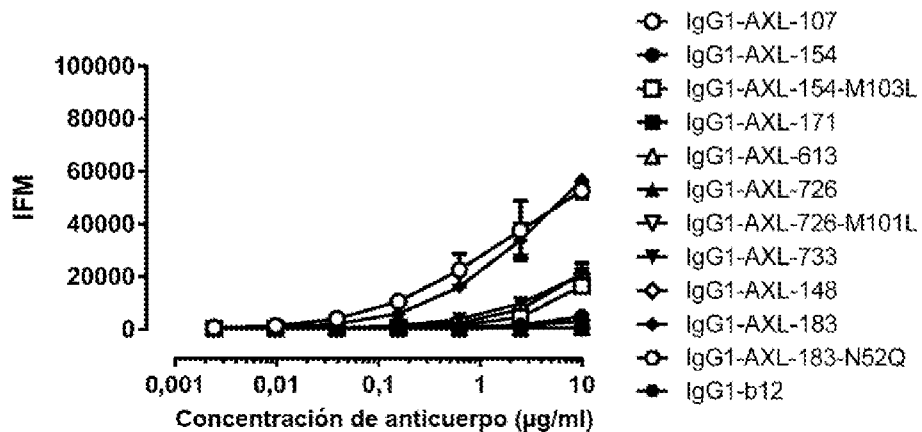


Figura 2

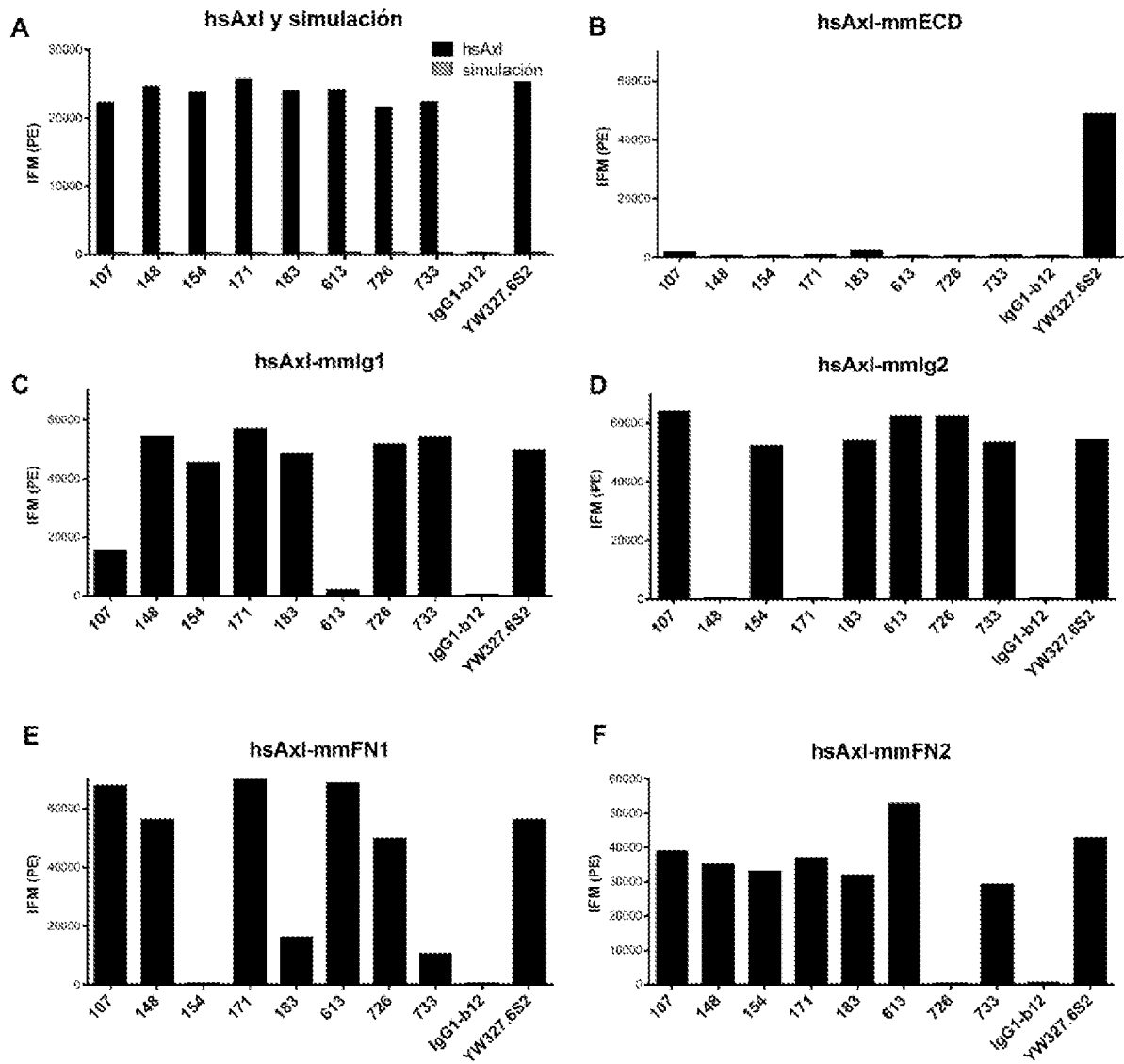


Figura 3

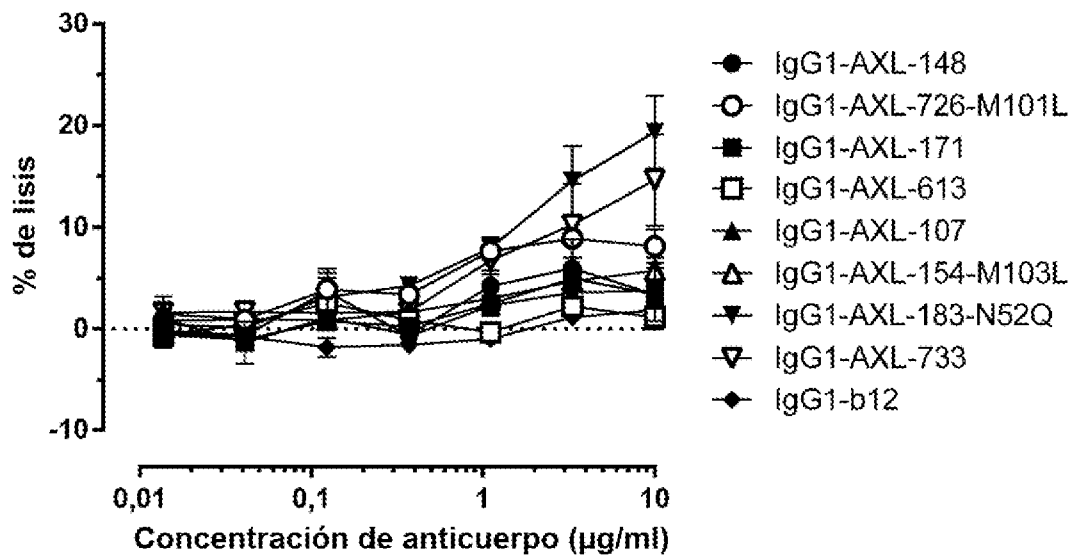


Figura 4

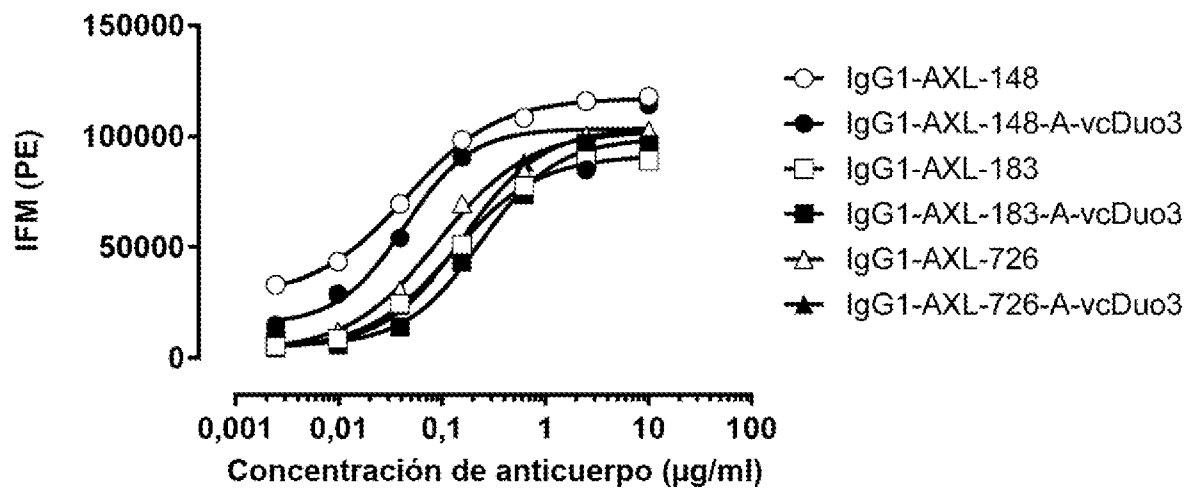
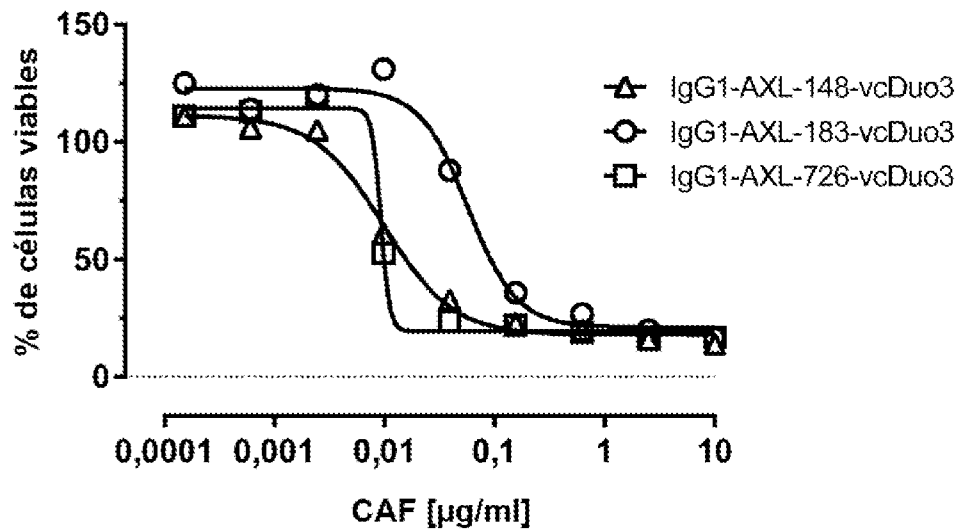


Figura 5

A



B

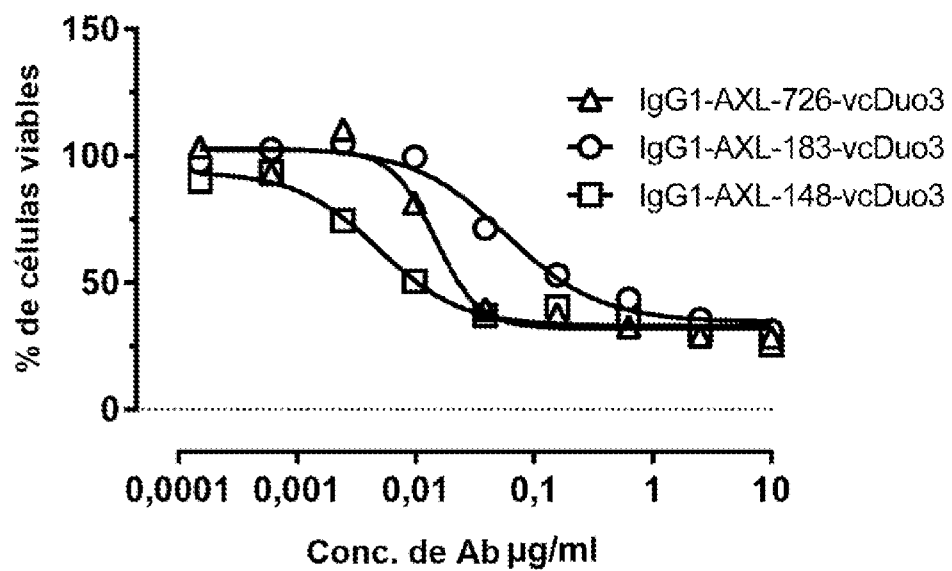


Figura 6

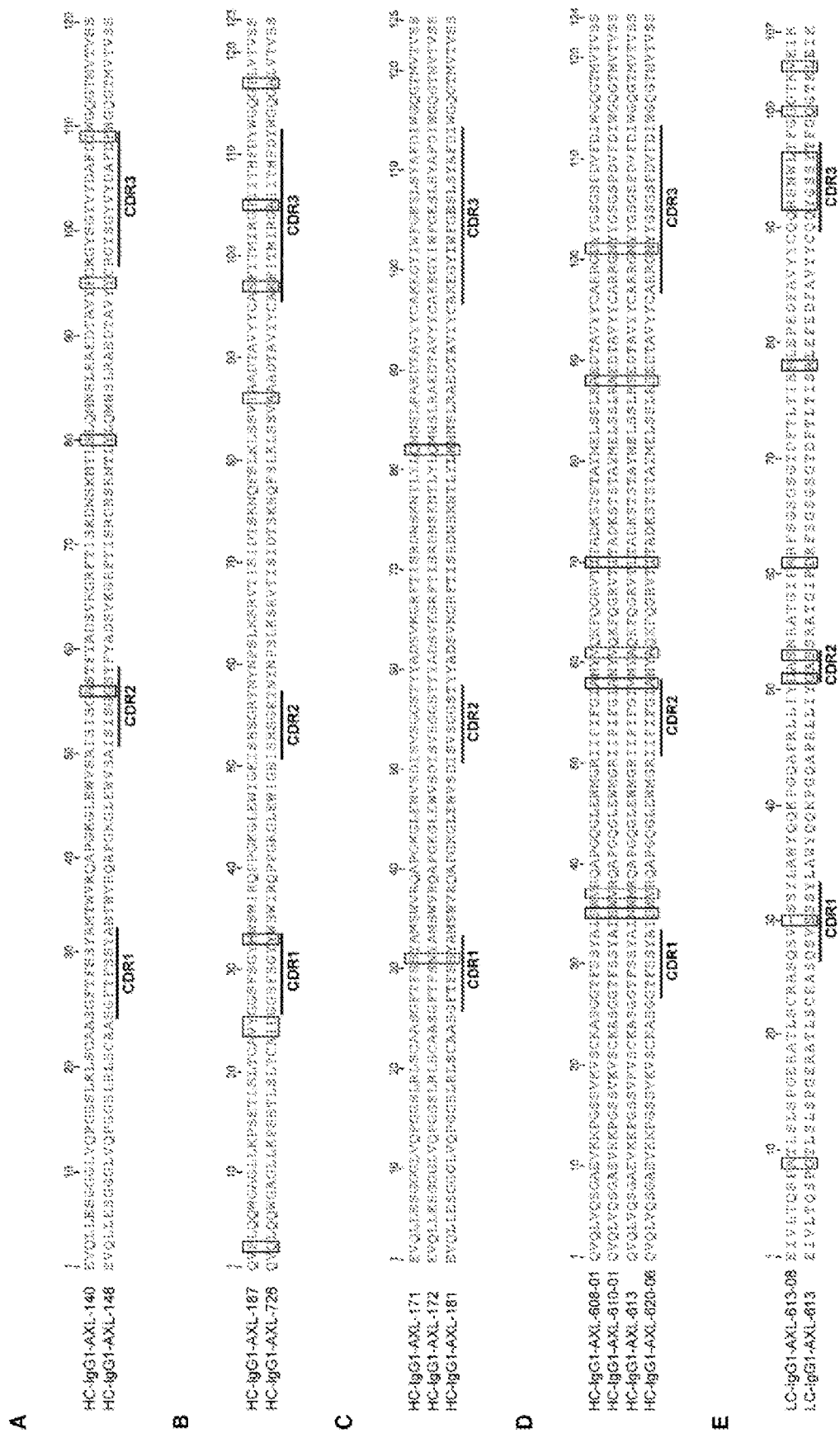


Figura 7

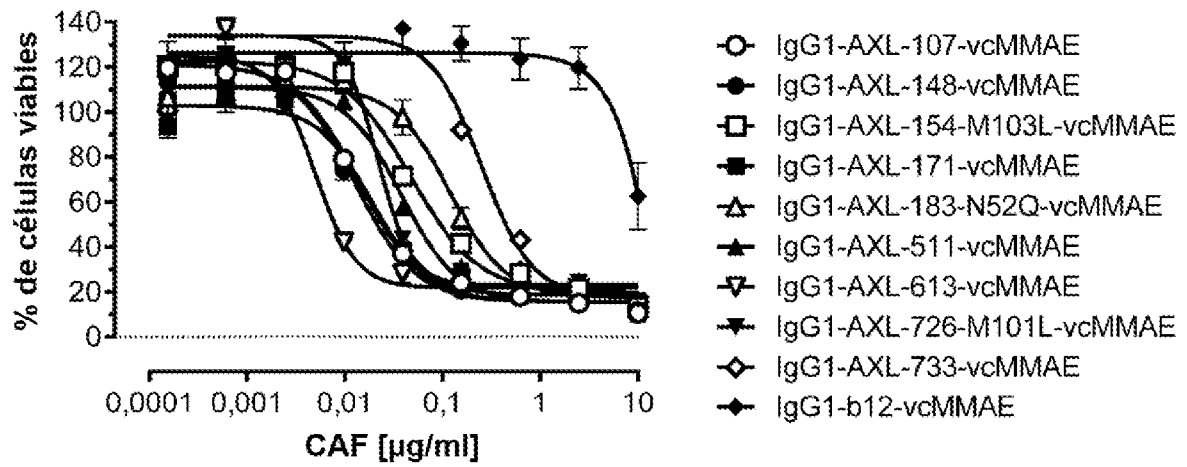


Figura 8

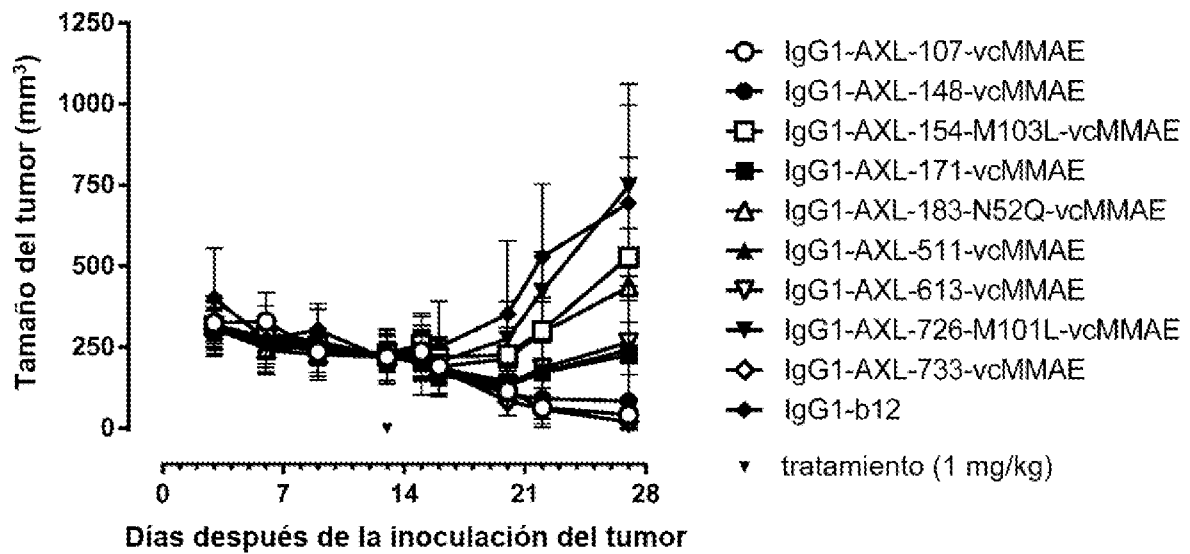


Figura 9

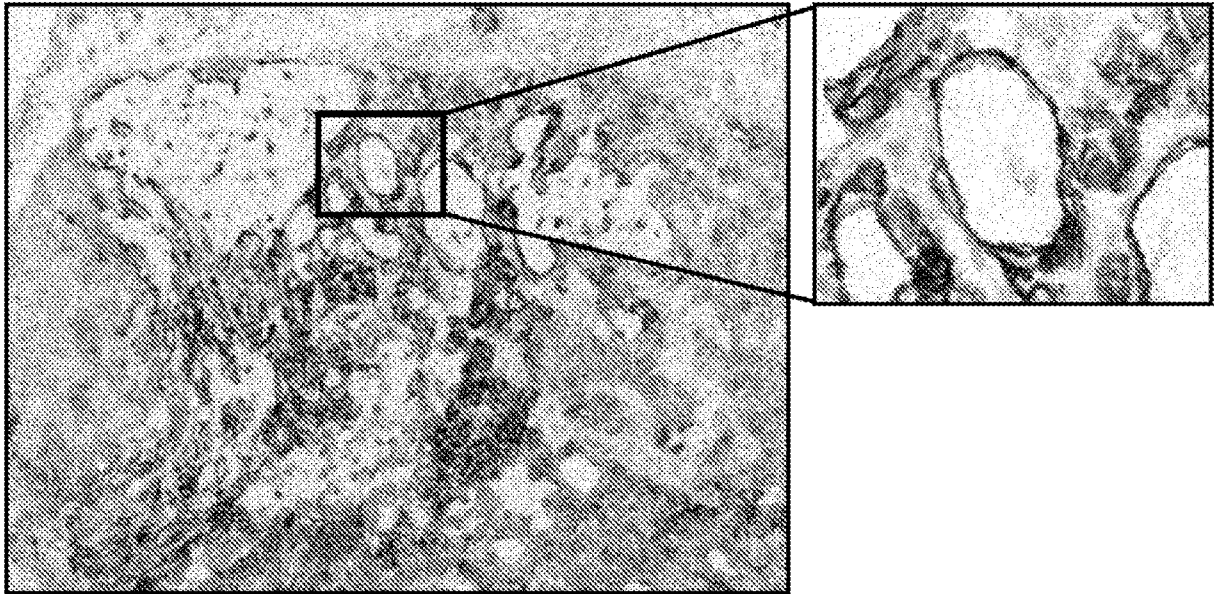
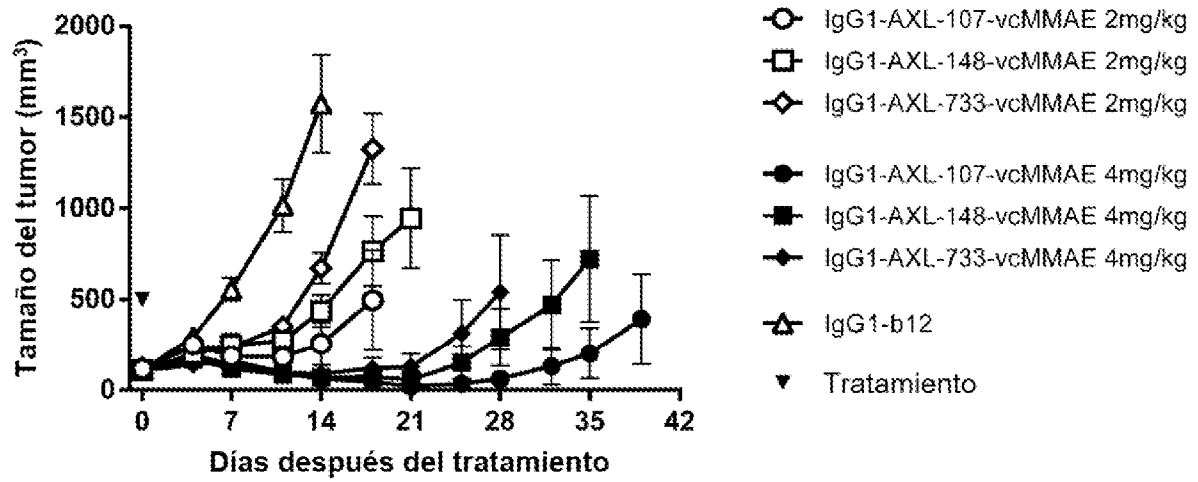


Figura 10

A



B

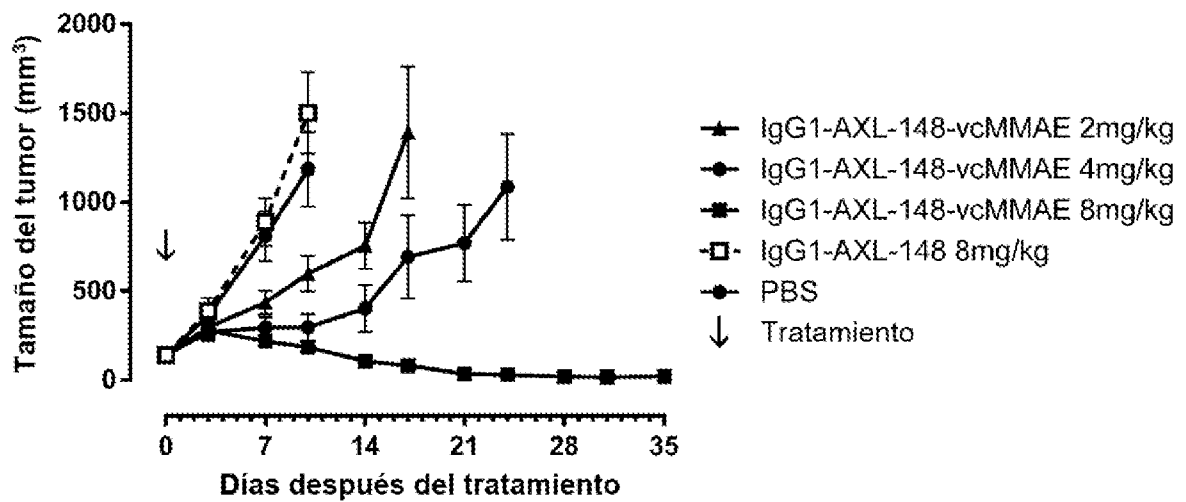


Figura 10 (continuación)

C

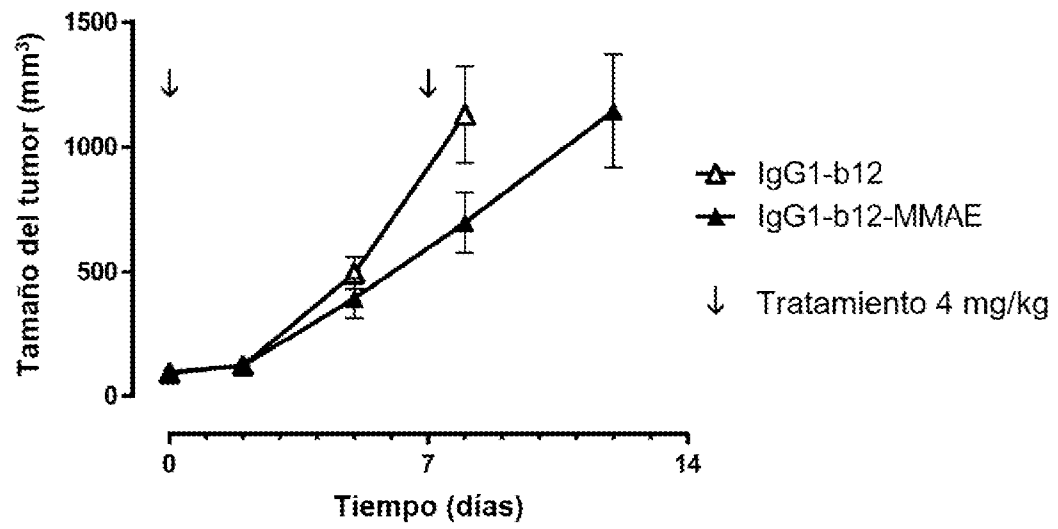


Figura 11

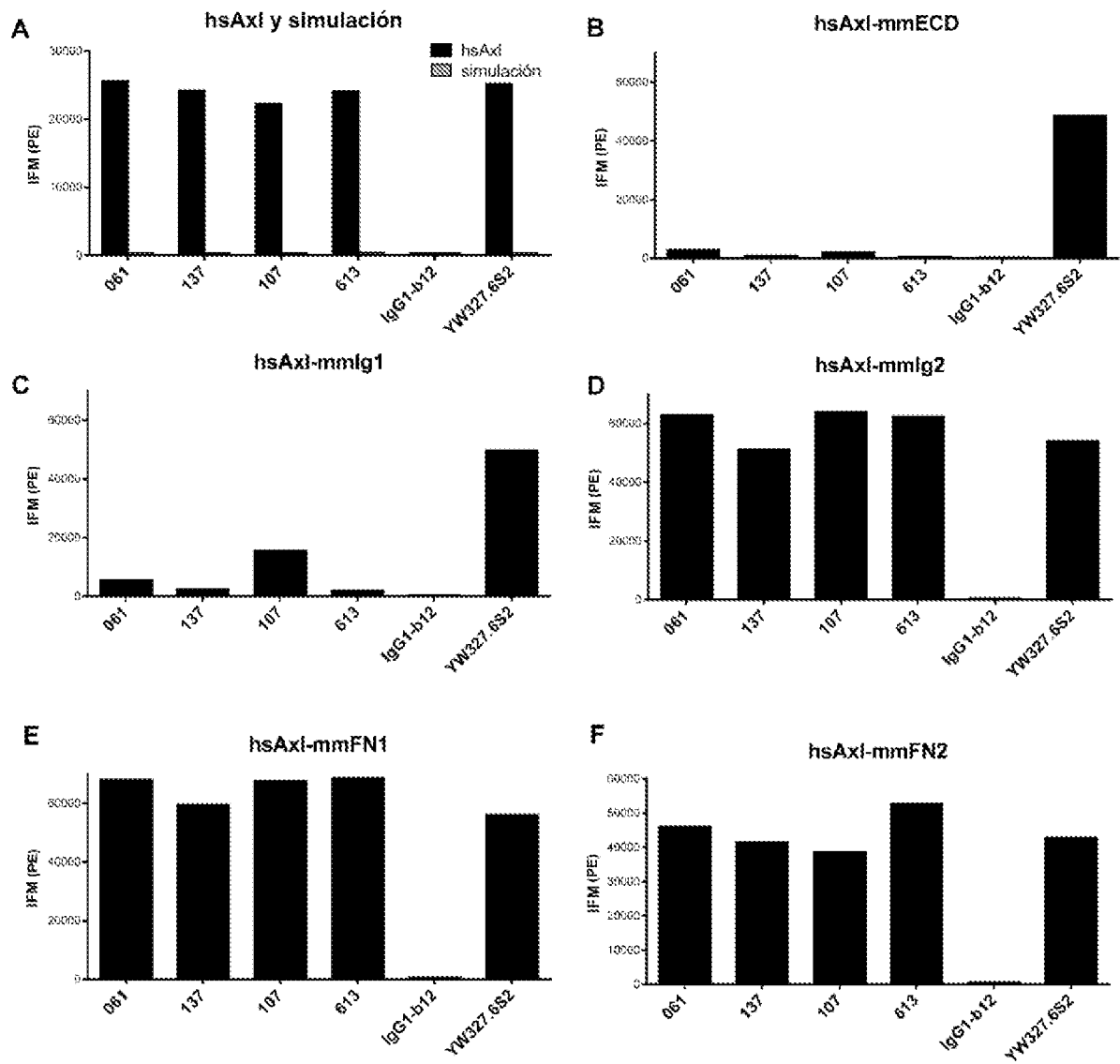


Figura 12

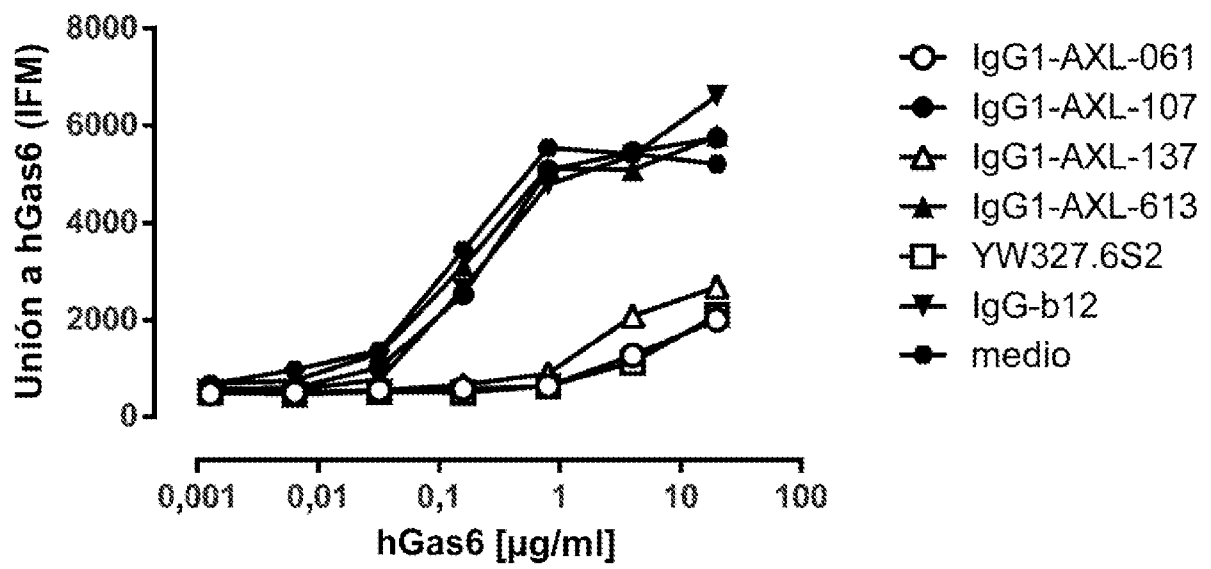
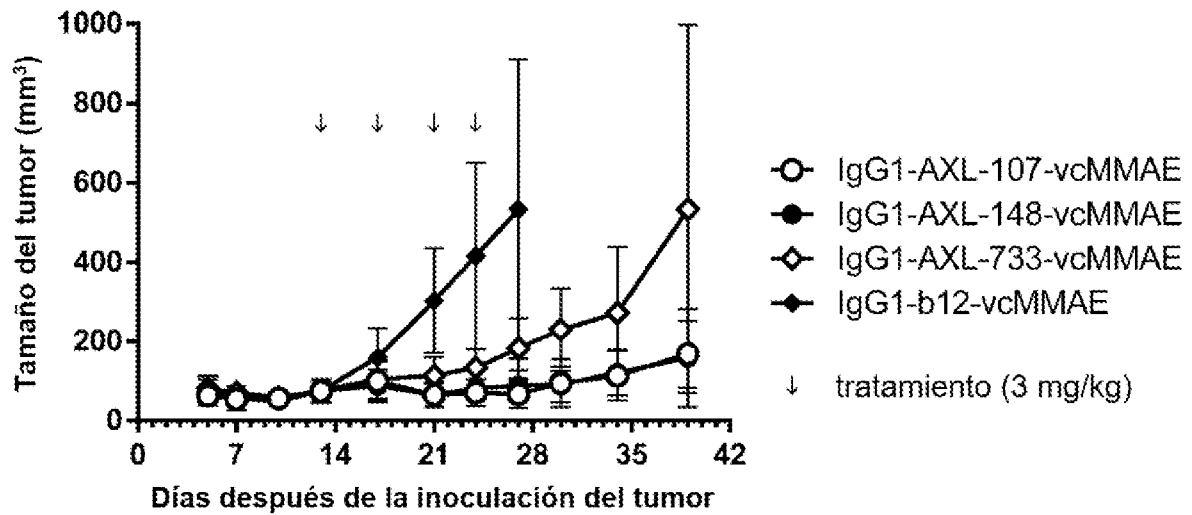


Figura 13

A



B

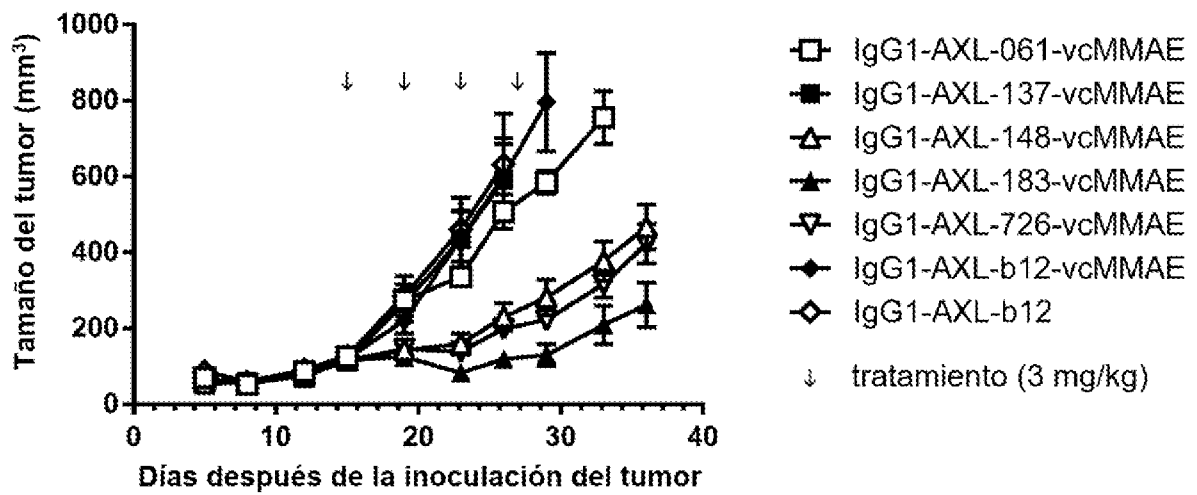
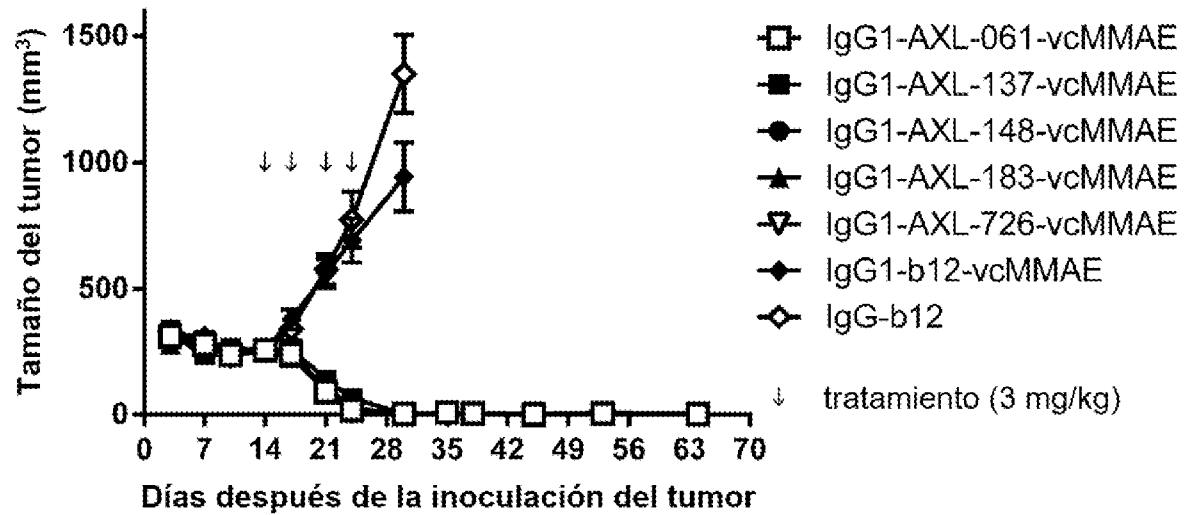


Figura 14

A



B

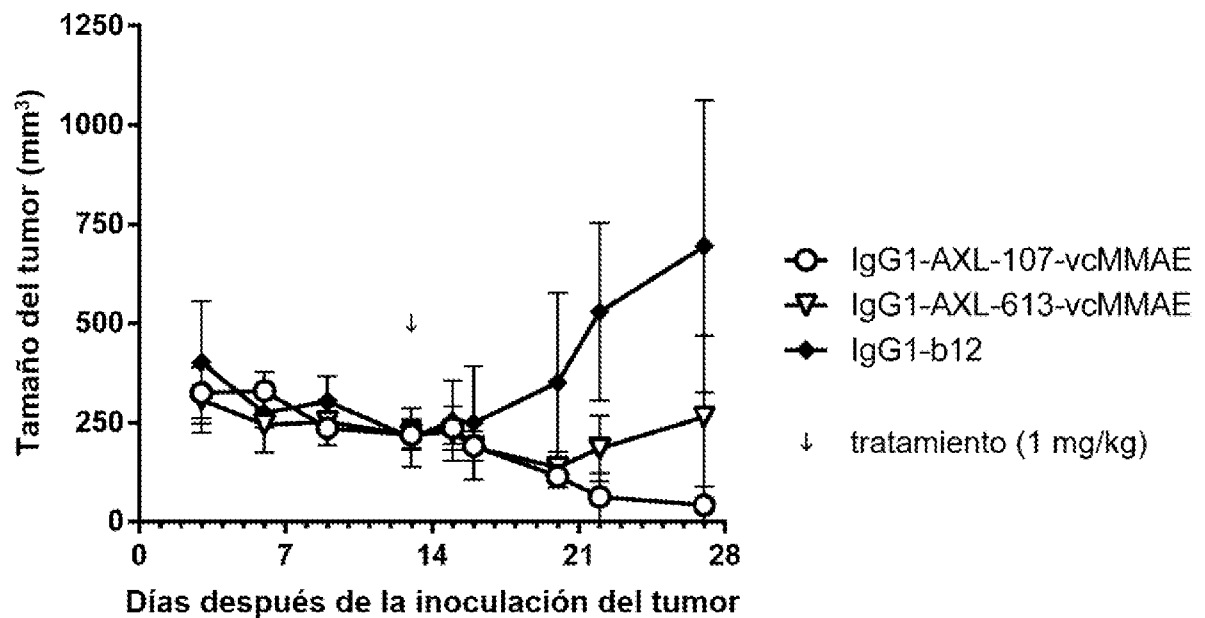
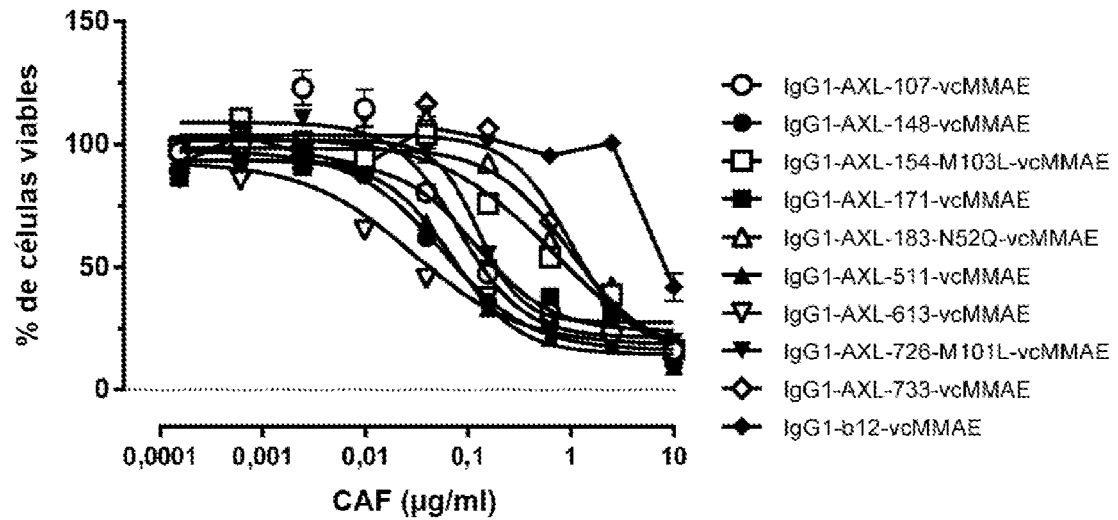


Figura 15

A



B

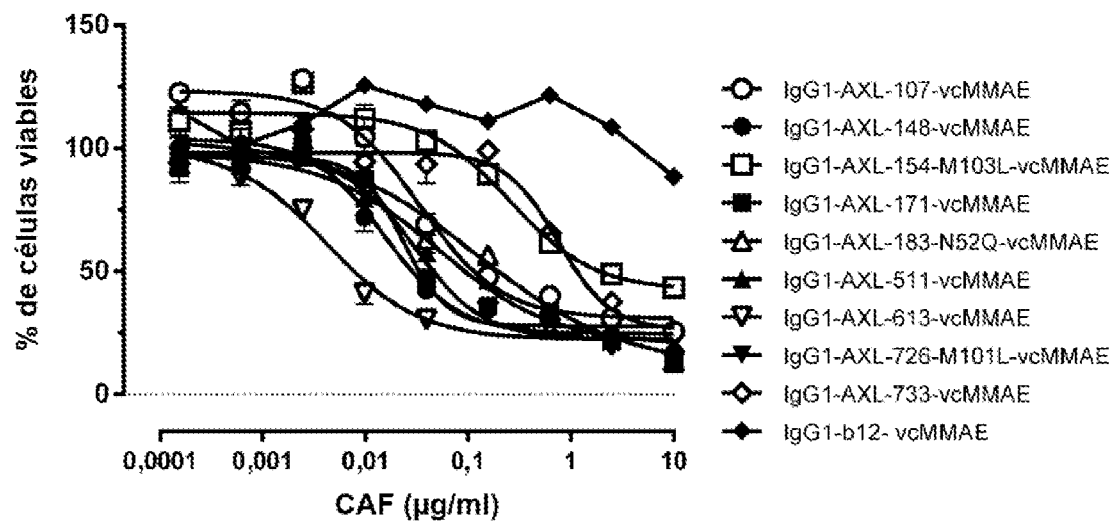


Figura 16

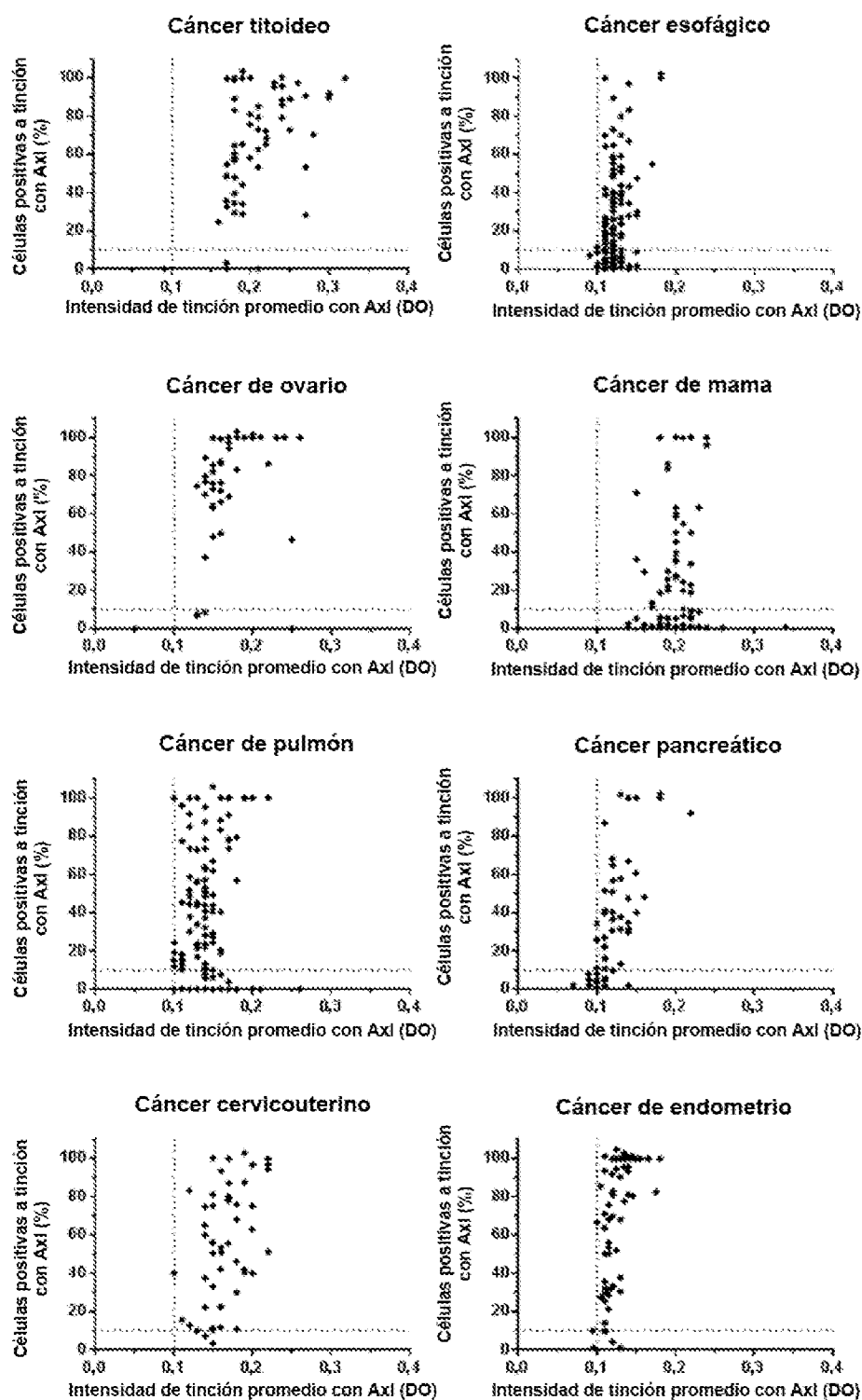


Figura 17

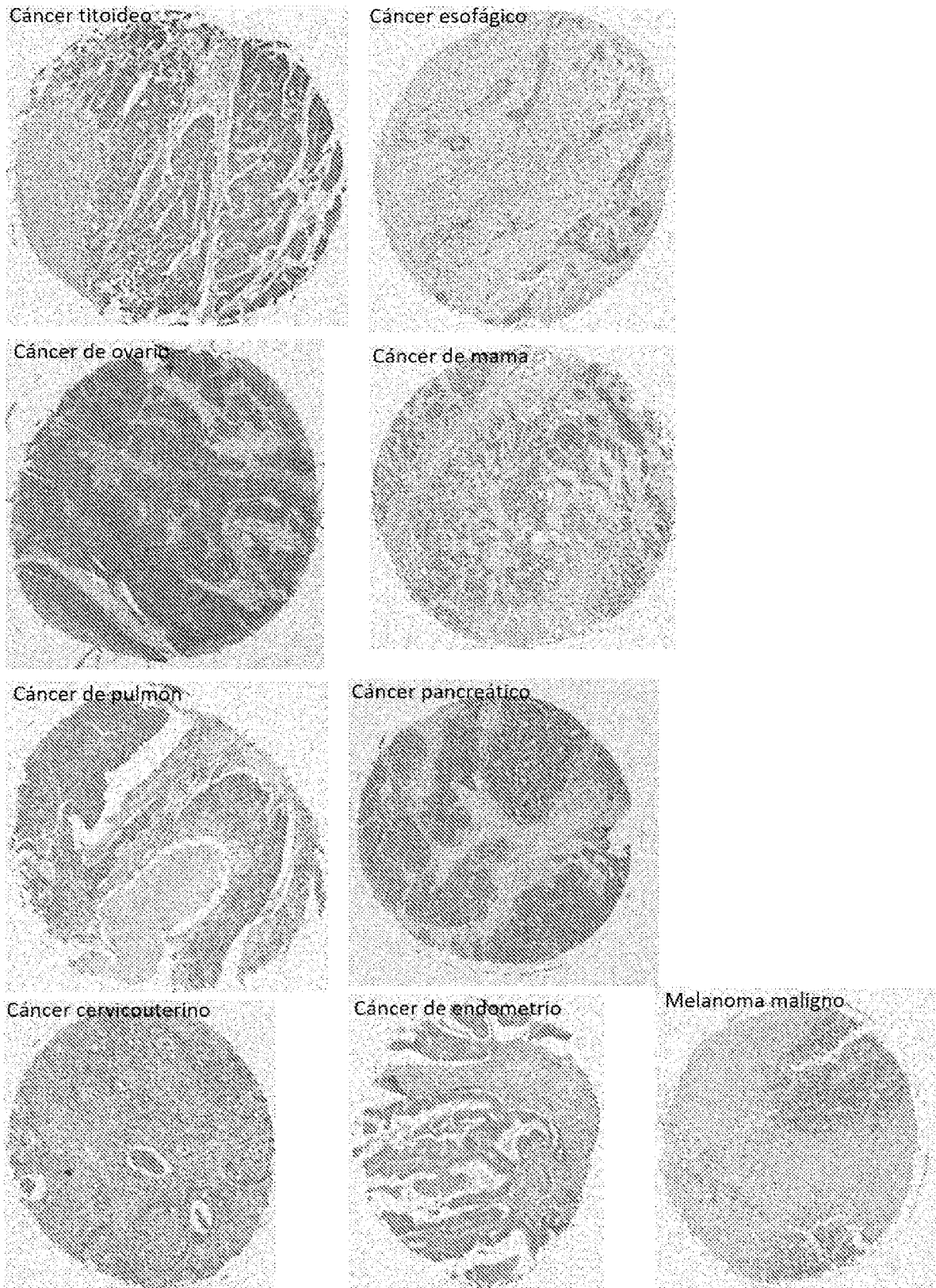
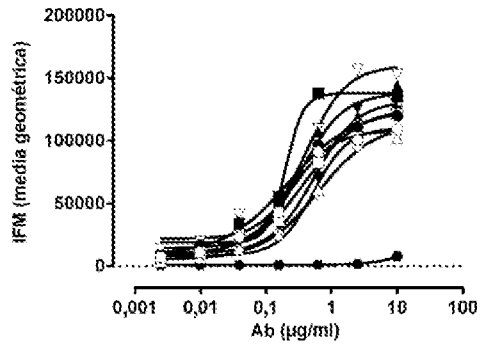
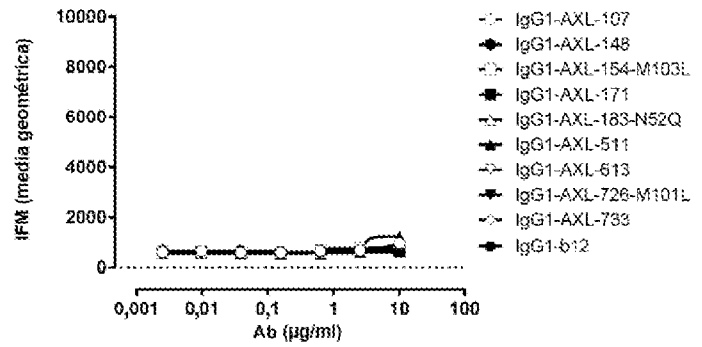


Figura 18

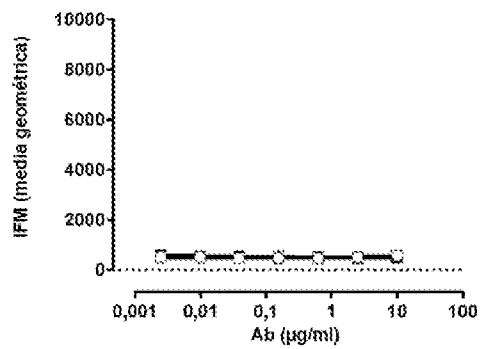
A



B



C



D

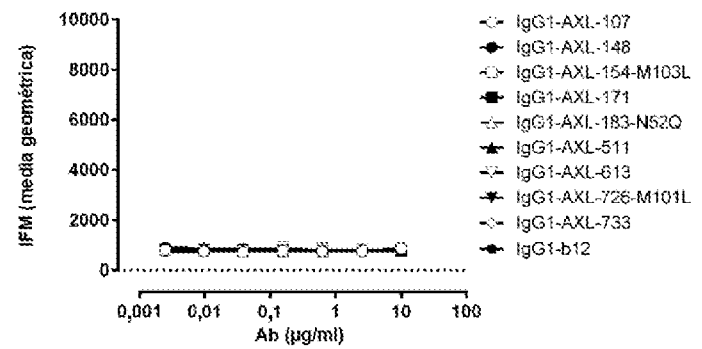
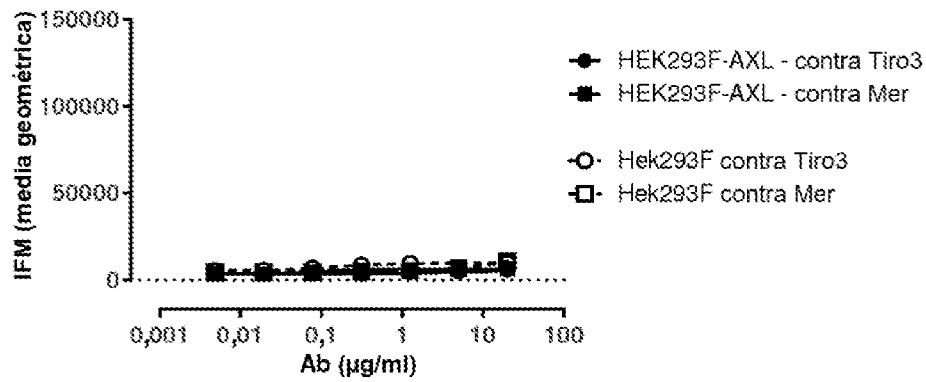
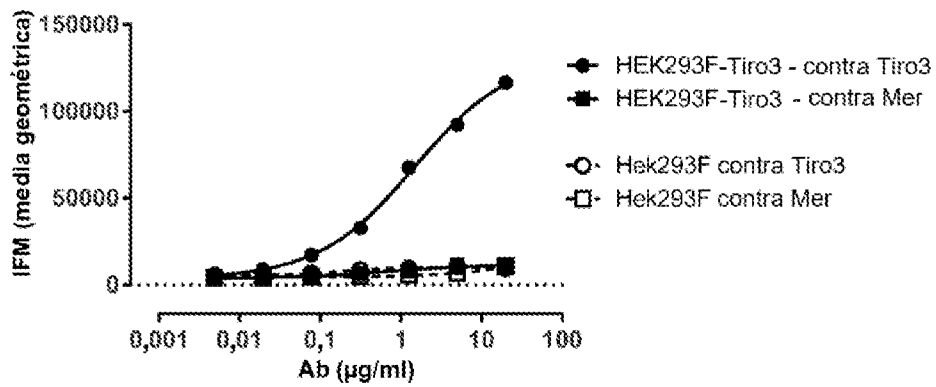


Figura 18 (continuación)

E



F



G

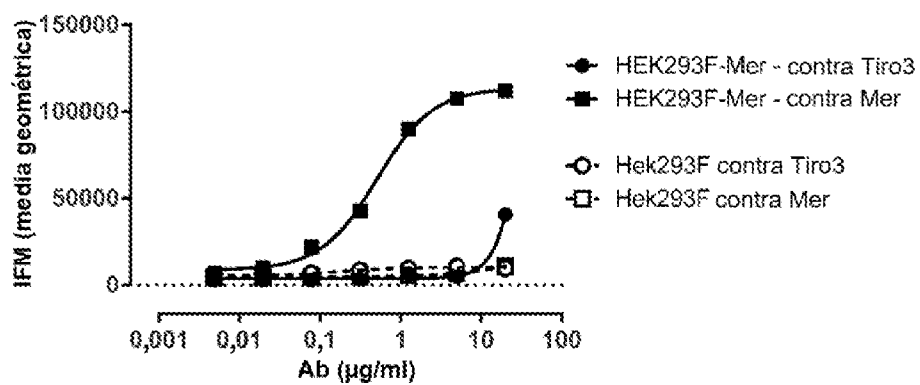


Figura 19

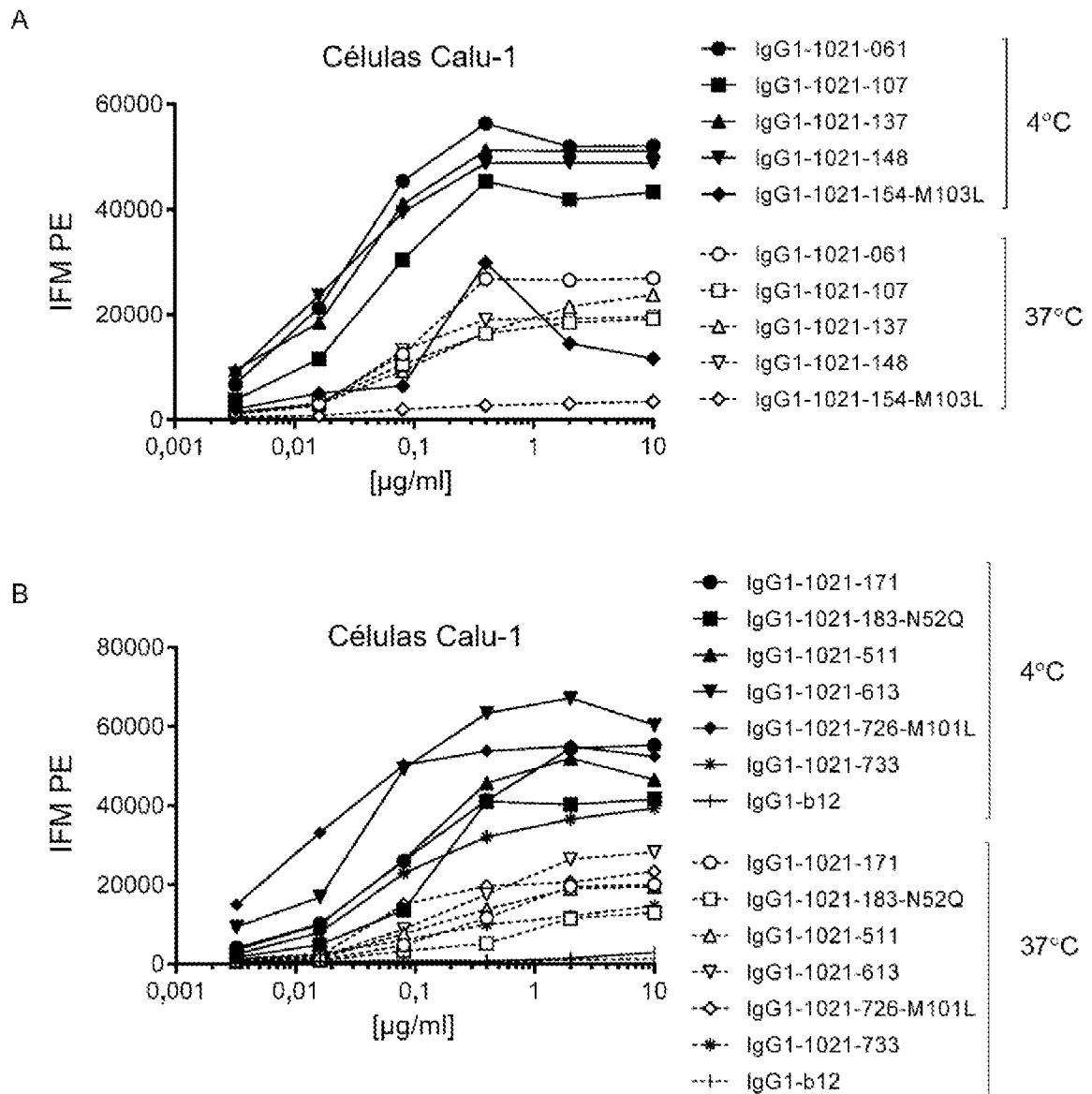


Figura 19 (continuación)

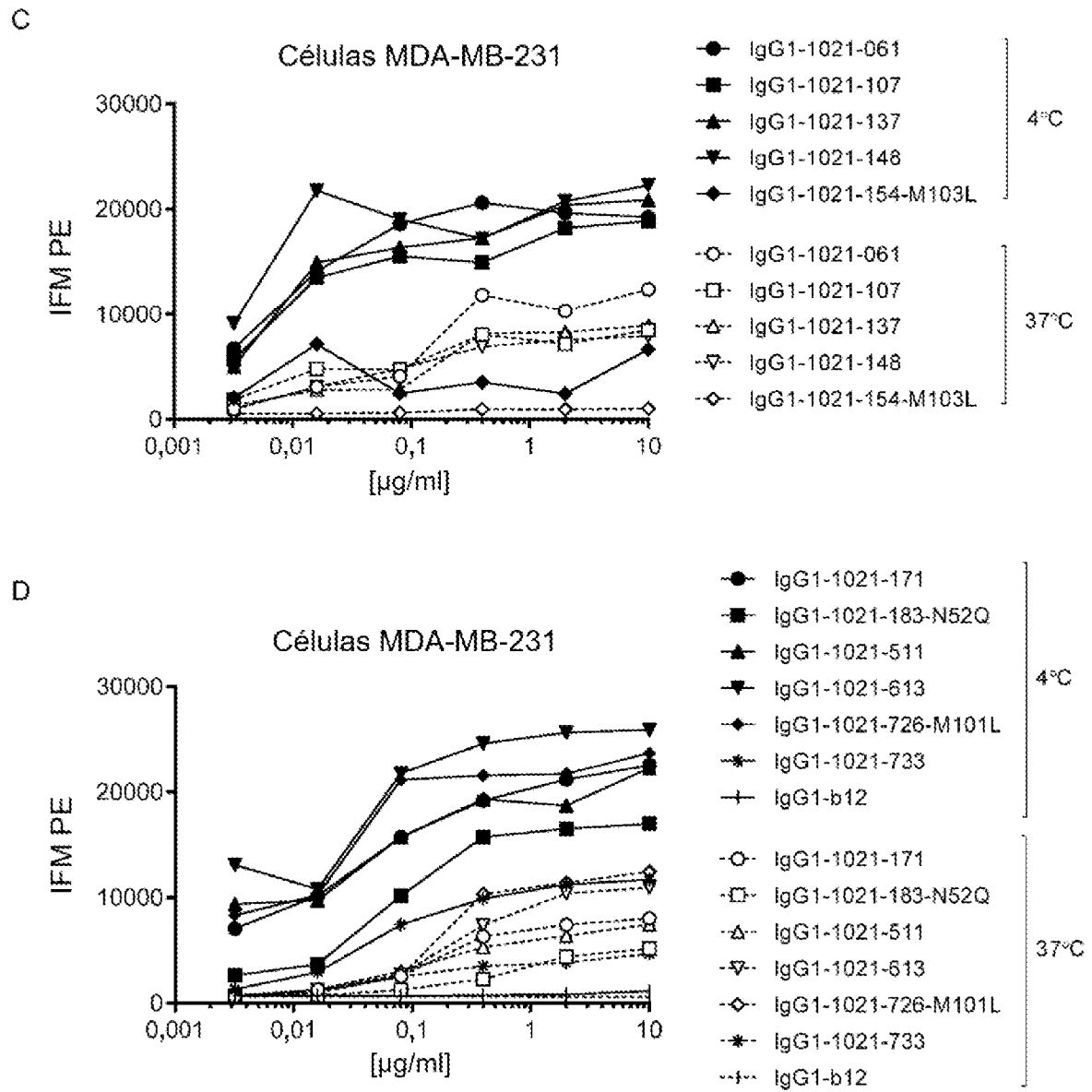


Figura 20

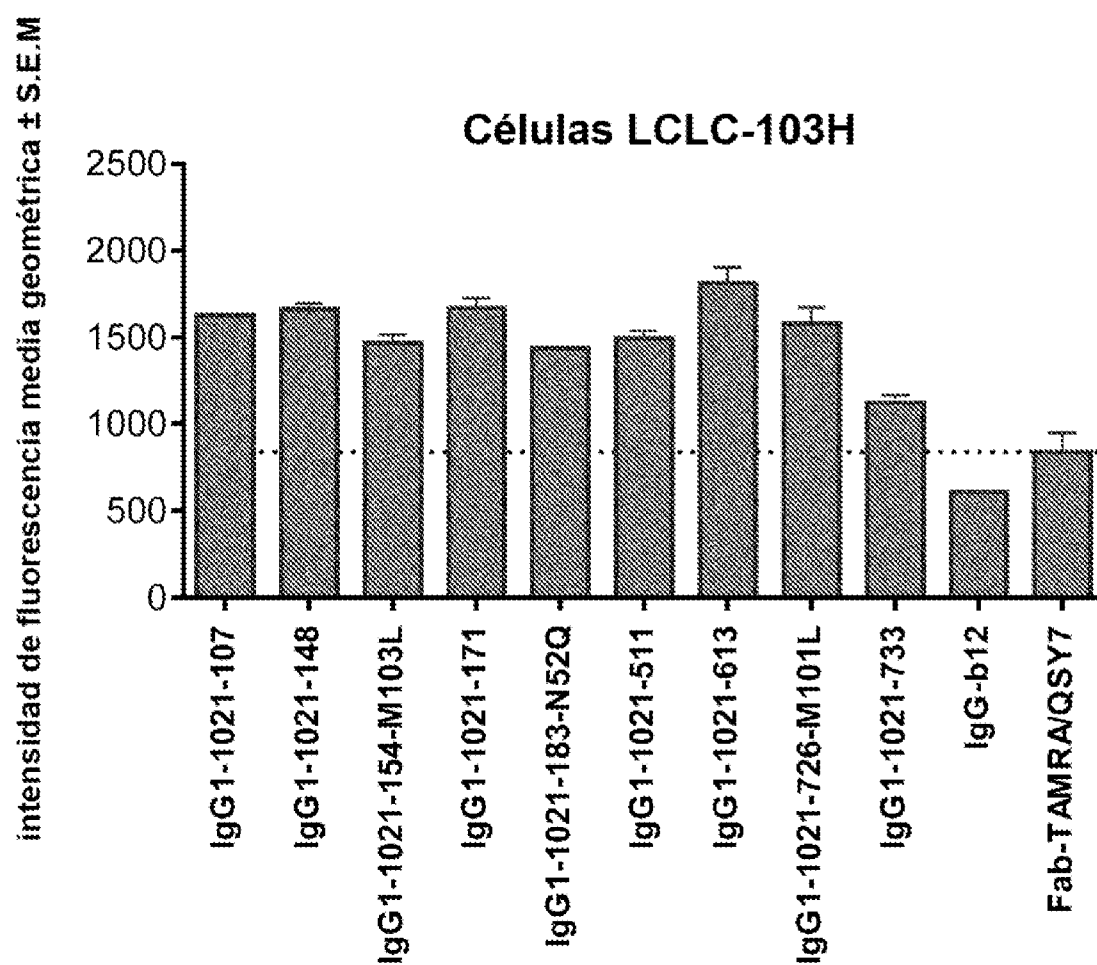
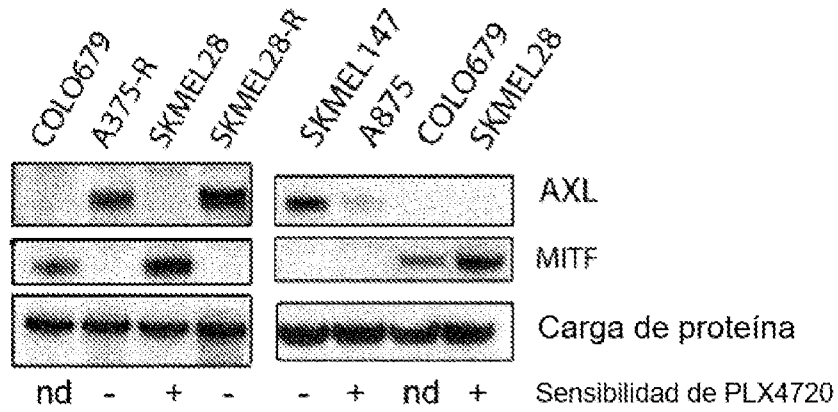


Figura 21

A



B

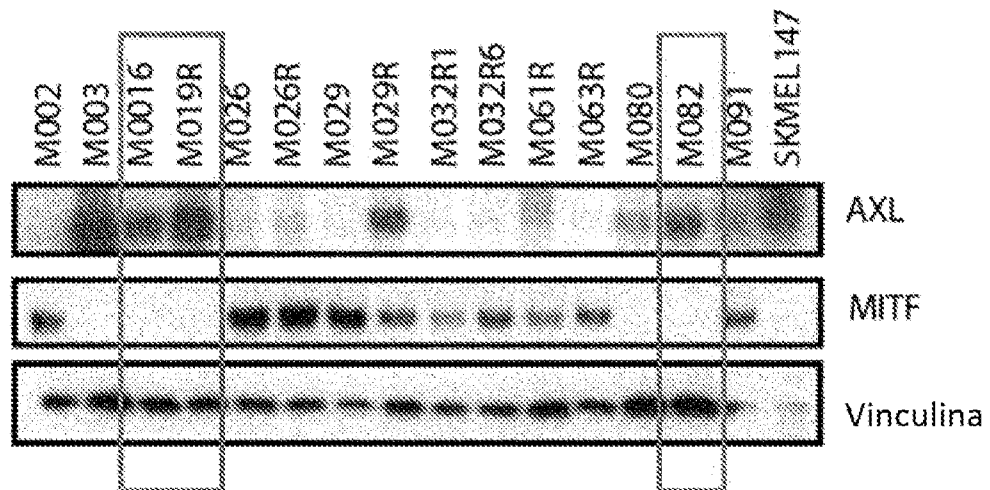


Figura 22

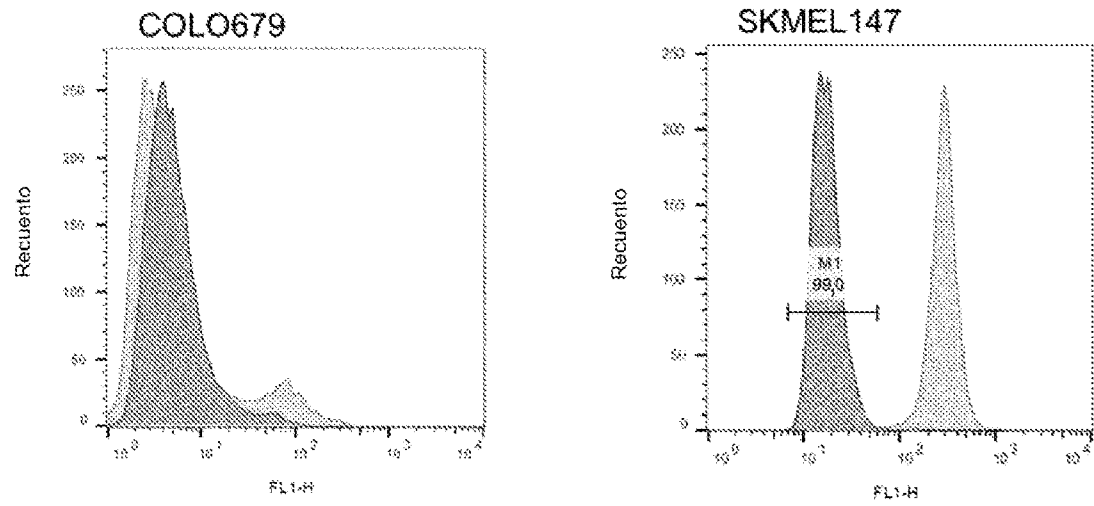


Figura 23

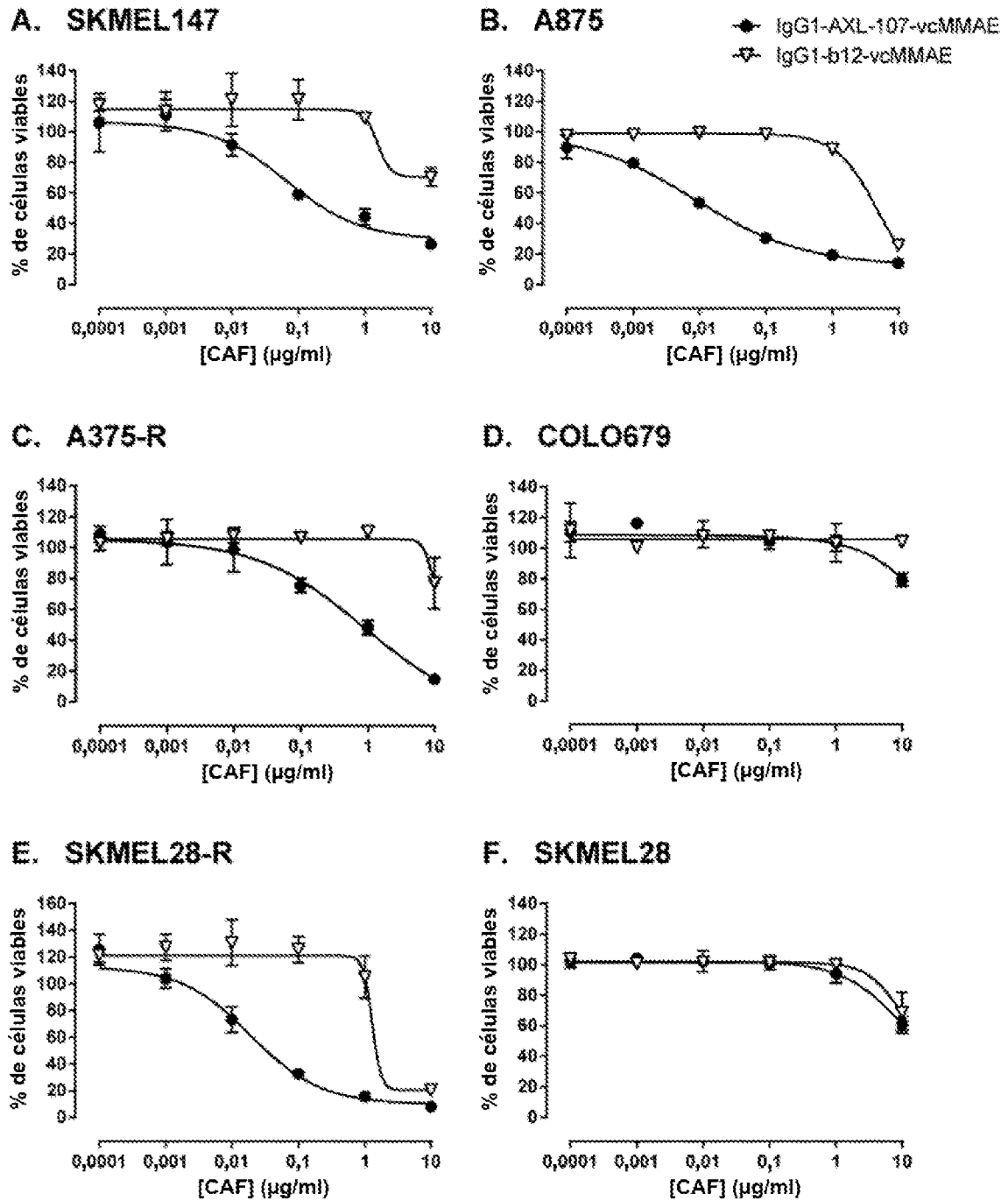


Figura 24

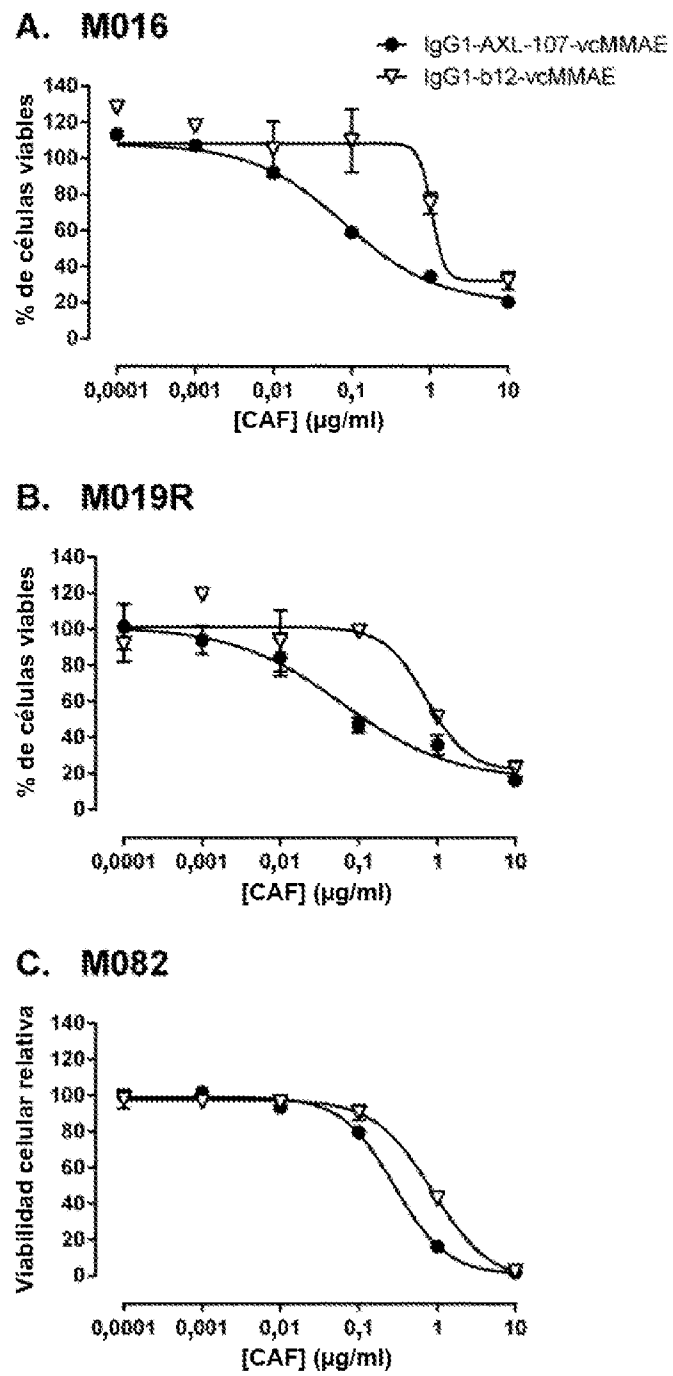
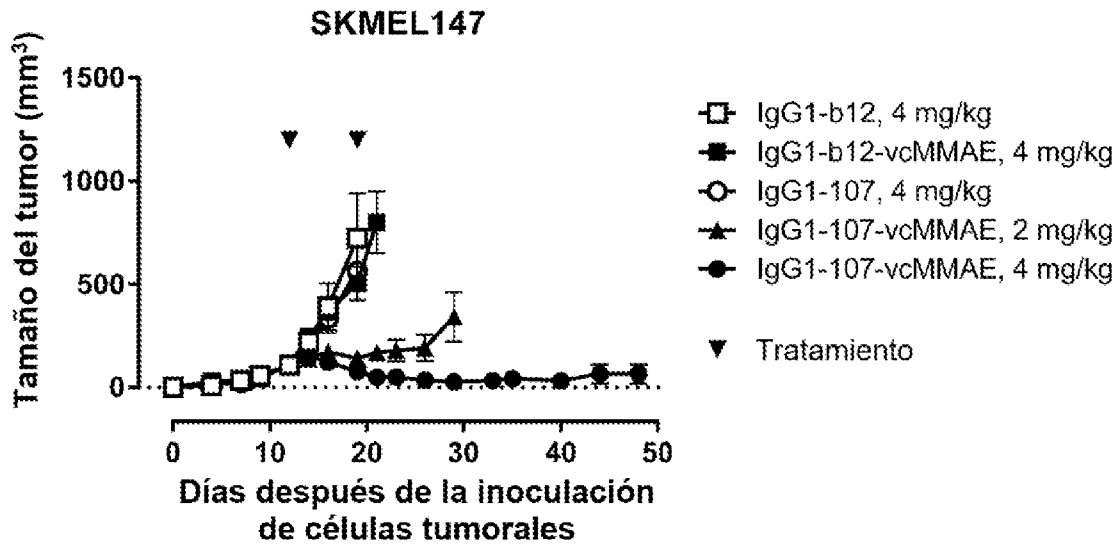


Figura 25

A



B

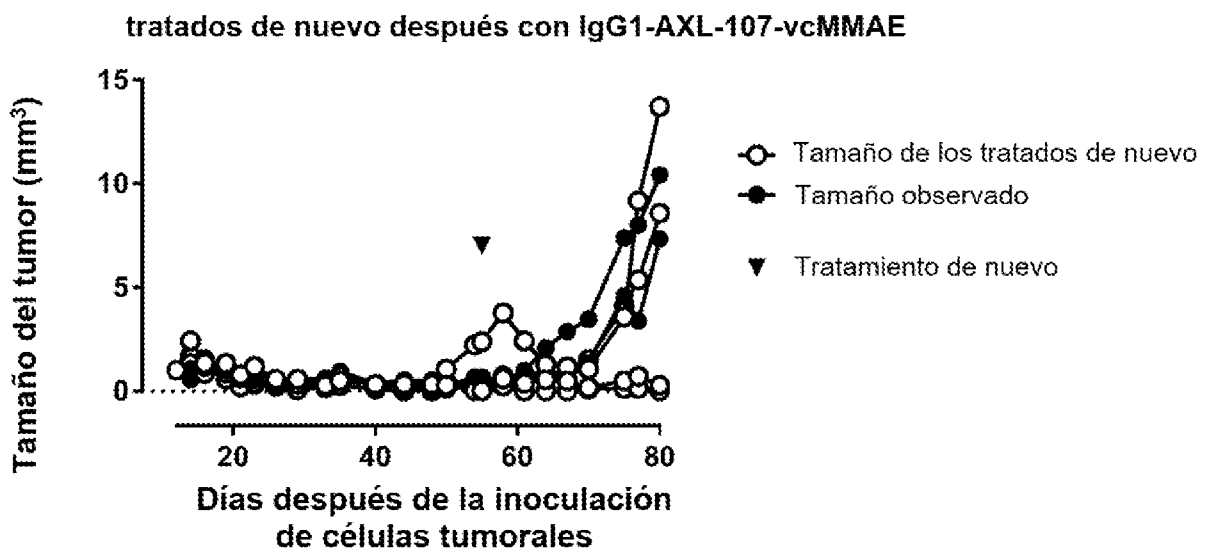
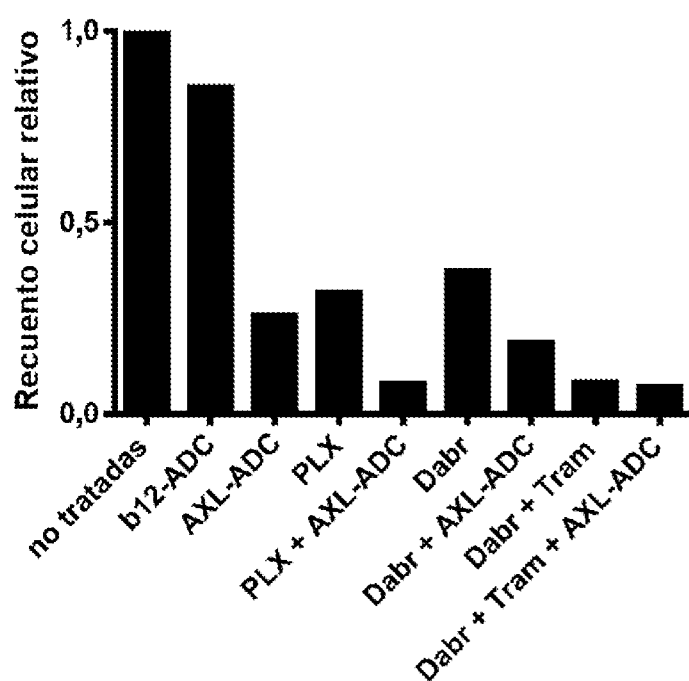


Figura 26

A



B

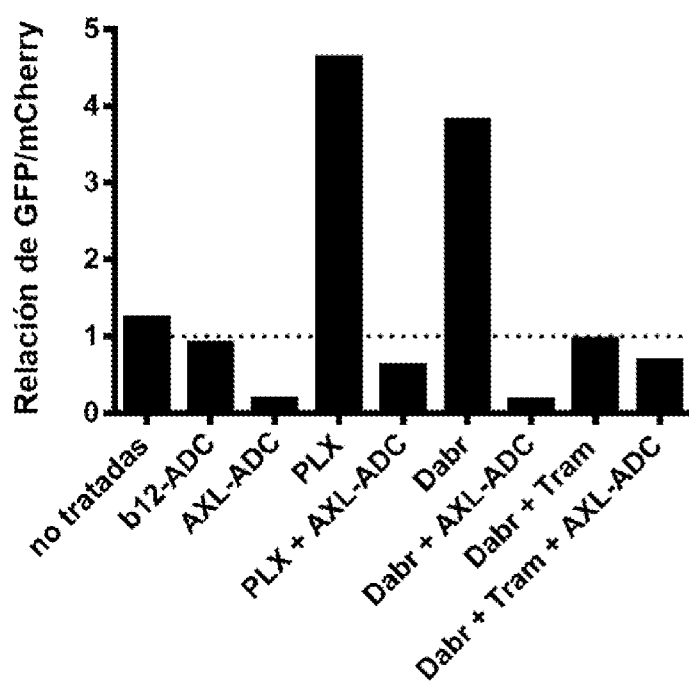
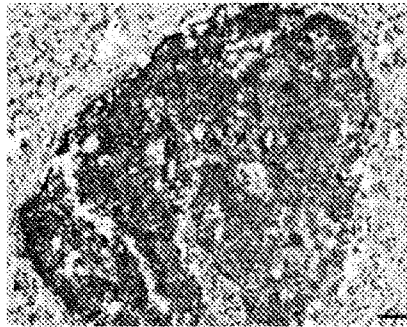
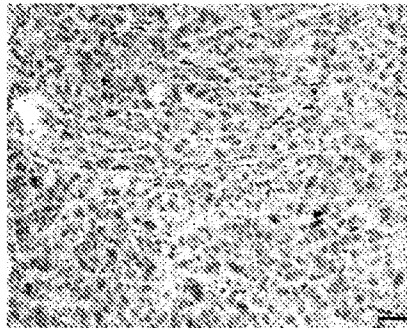


Figura 27

A



B



C



D

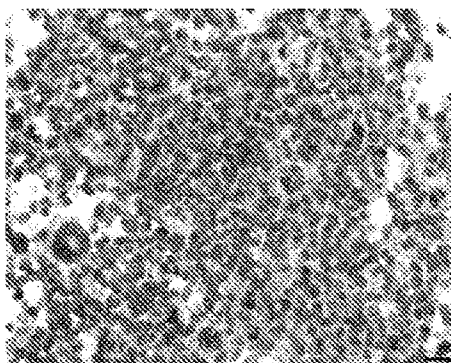
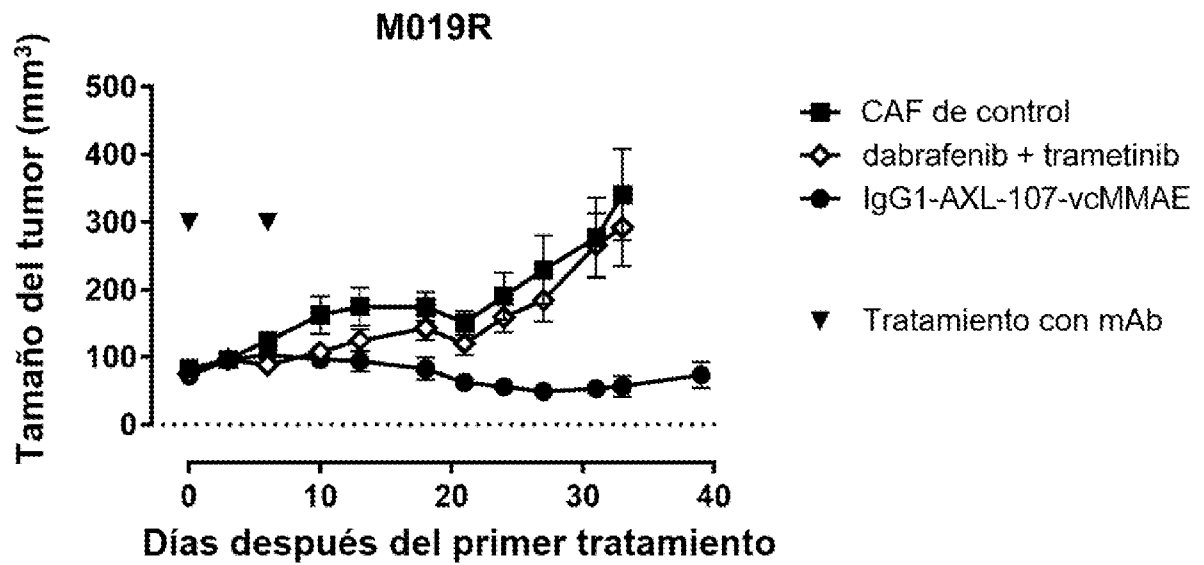


Figura 28

A



B

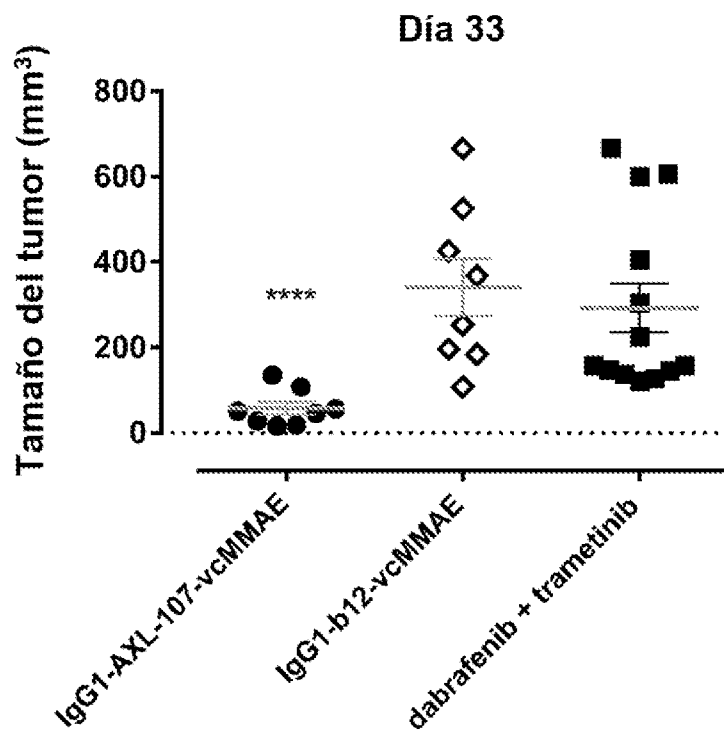


Figura 28 (continuación)

c

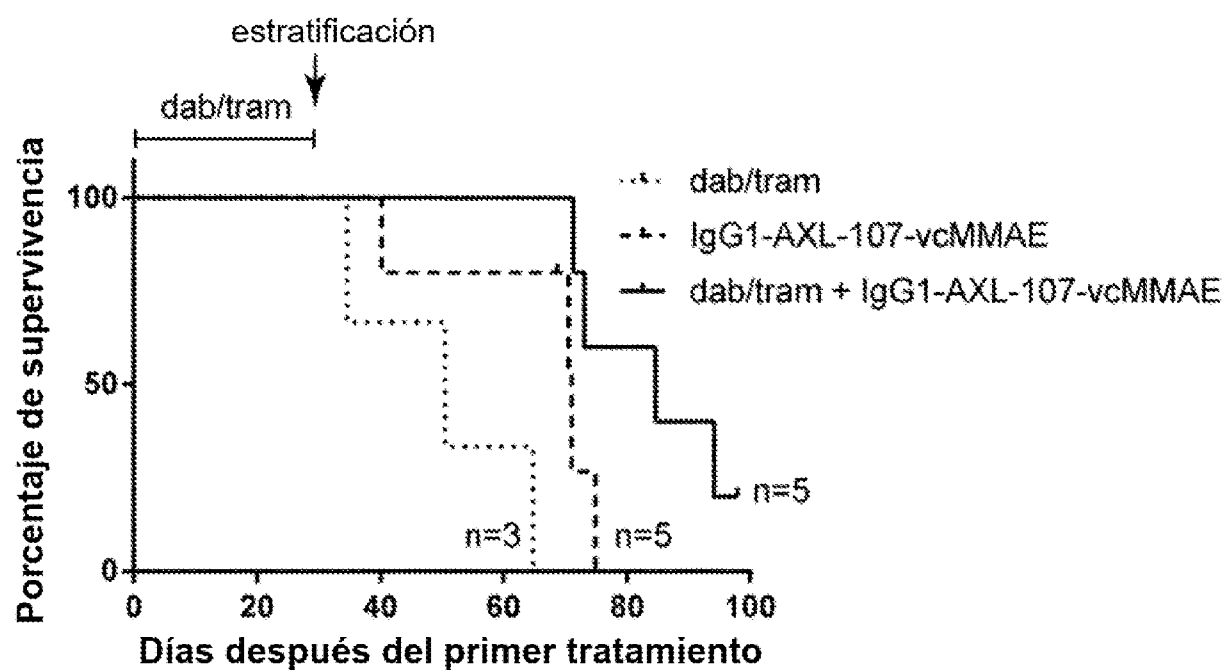
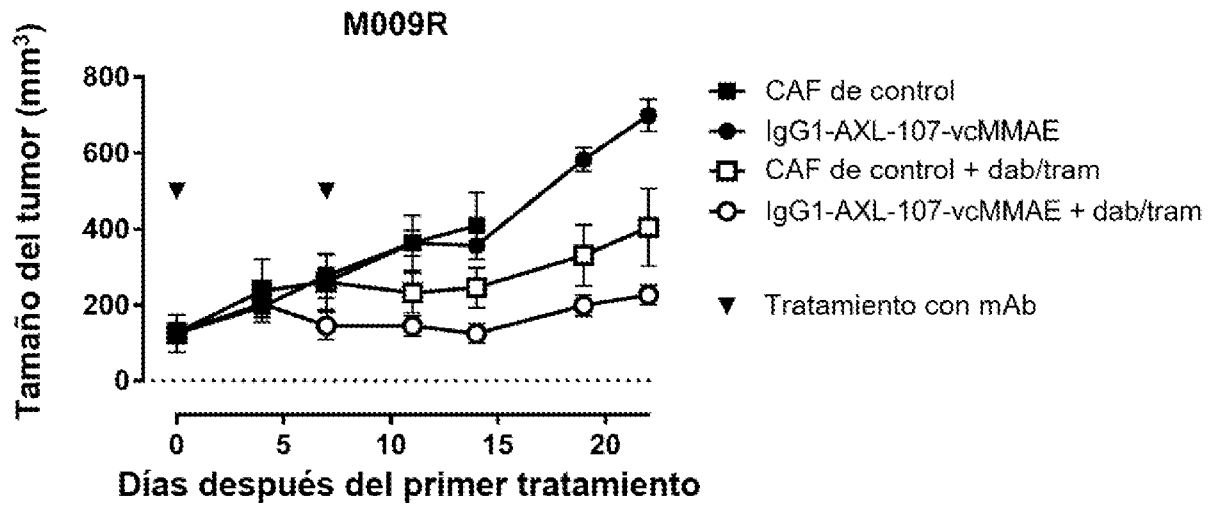


Figura 29

A



B

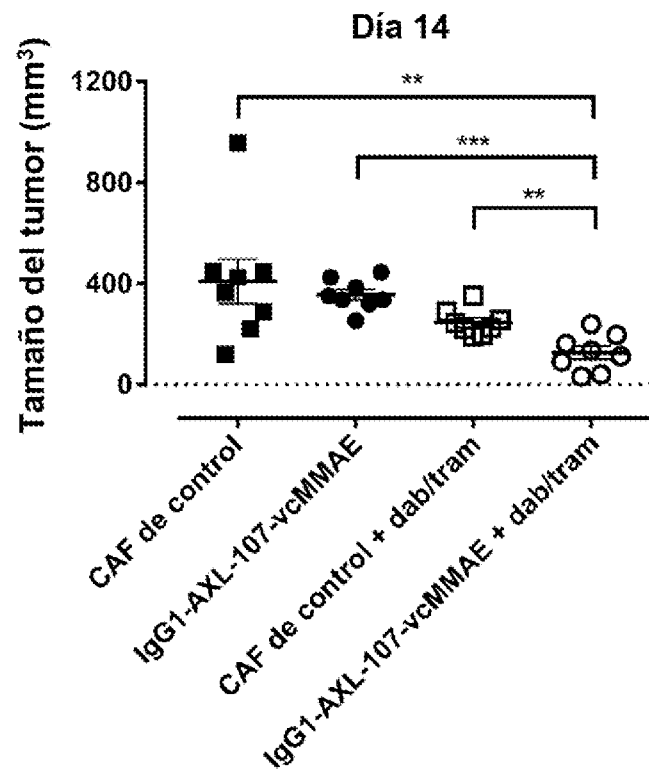


Figura 30

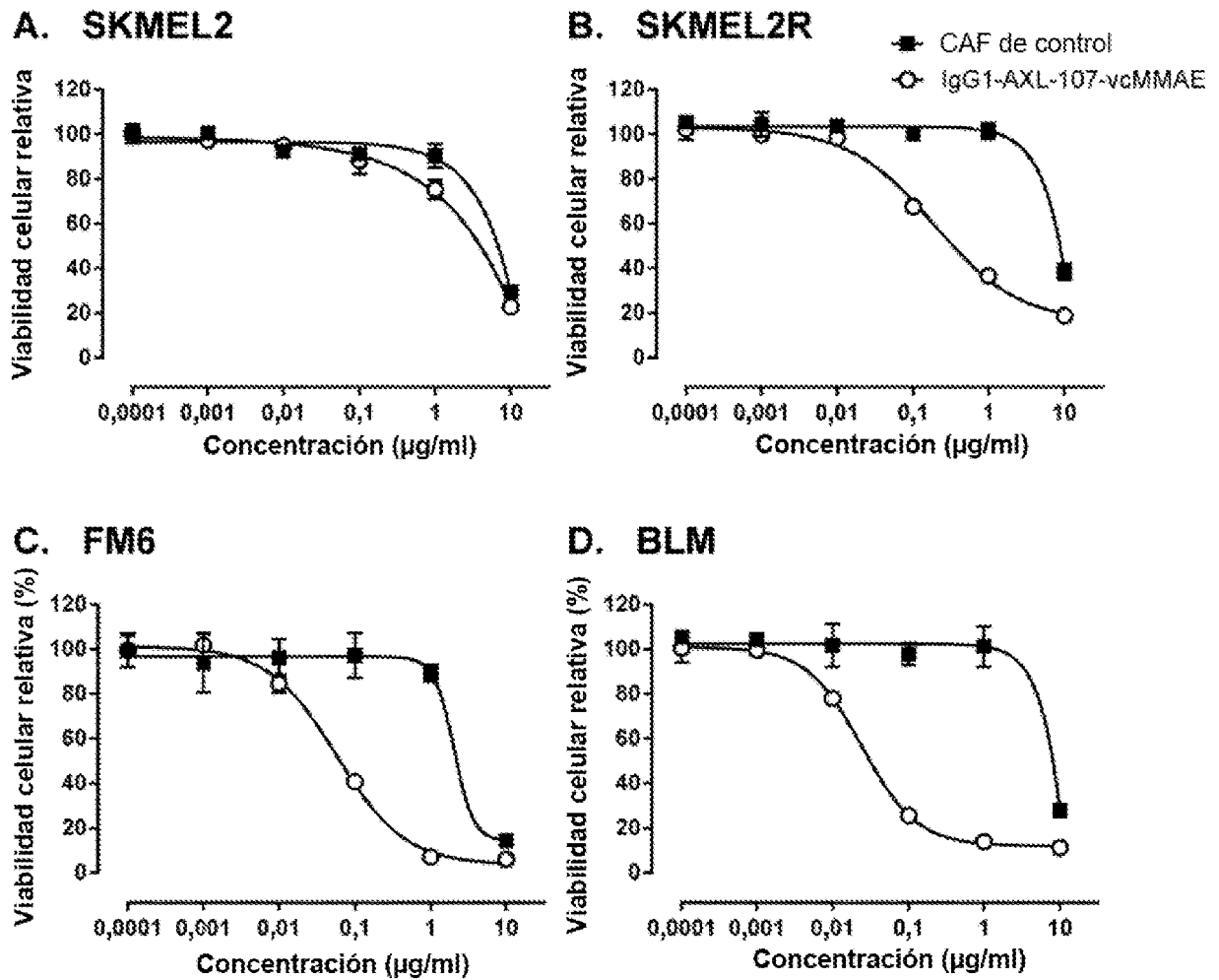


Figura 31

