

ANTICUERPOS ANTI-LY6G6D Y MÉTODOS DE USO

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó
5 electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 10 de diciembre de 2020, se titula 50474-184WO2_Sequence_Listing_12.10.20_ST25 y su tamaño es de 146.127 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

10 En la presente se proporcionan anticuerpos anti-Ly6G6D (complejo 6 del antígeno linfocítico, locus G61) y métodos para el uso de estos.

ANTECEDENTES

El cáncer continúa siendo una de las amenazas más letales para la salud humana. En
15 los Estados Unidos de América, el cáncer afecta a más de 1,7 millones de pacientes nuevos cada año y es la segunda causa principal de muerte después de la cardiopatía, ya que es la causa de aproximadamente una de cada cuatro muertes. El cáncer colorrectal (CRC), en particular, es la tercera causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos de América, y las tasas de supervivencia a cinco años son bajas
20 para los pacientes con CRC avanzado. El cáncer, tal como el CRC, representa una amenaza y carga considerable y cada vez mayor para la sociedad.

Los enfoques a largo plazo para el tratamiento del cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia y cirugía para extirpar tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias a base de anticuerpos biespecíficos. Tales anticuerpos biespecíficos
25 son capaces de unir simultáneamente antígenos de superficie celular en células citotóxicas y células tumorales, a fin de que la célula citotóxica unida destruya la célula tumoral unida.

Existe una necesidad no satisfecha en el campo de desarrollo de inmunoterapias eficaces a base de anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, inmunoterapias a base de
30 anticuerpos biespecíficos anti-LY6G6D) para usar en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, CRC).

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones para el tratamiento del cáncer. También se proporcionan formulaciones y métodos de uso.
35 En un primer aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une frente al

miembro G6D de la familia de antígenos linfocíticos 6 (LY6G6D), en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 111; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; y (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o cualquiera de SEQ ID NO: 99-107. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 99-107.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 O SEQ ID NO: 113; y (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En algunos aspectos, (a) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (b) el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o (c) el anticuerpo comprende a VH1 como en (a) y un VL1 como en (b).

En algunos aspectos, el VH1 comprende las siguientes regiones estructurales (FR): (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunos aspectos, el VH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En algunos aspectos, el VH1 comprende las siguientes FR: (a) una FR-H1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunos aspectos, el

5 VH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

En algunos aspectos, el VL1 comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En algunos aspectos, el VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos, el VL1 comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (c) una FR-L3 que

15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En algunos aspectos, el VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un

20 polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio VH (VH1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y el L1 comprende un dominio VL (VL1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un

25 polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio VH (VH1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y el L1 comprende un dominio VL (VL1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

30 En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un polipéptido LY6G6D humano con una K_D de alrededor de 100 pM a 10 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore. En algunos aspectos, el anticuerpo se une al polipéptido LY6G6D humano con una K_D de 6,0 nM o menor; 4 nM o menor; o 2 nM o menor.

En algunos aspectos, el anticuerpo es monoclonal, humano, humanizado o quimérico.

35 En algunos aspectos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a

LY6G6D. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo IgG.

- 5 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo multiespecífico o un anticuerpo biespecífico.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se une al grupo de diferenciación 3 (CD3) y comprende un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), en donde el H2
10 comprende un dominio VH (VH2) y el L2 comprende un dominio VL (VL2).

En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 es capaz de unirse a un polipéptido CD3 humano o un polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis*. En algunos aspectos, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3ε humano o un polipéptido CD3ε de *Macaca fascicularis*, respectivamente. En
15 algunos aspectos, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3γ humano o un polipéptido CD3γ de *Macaca fascicularis*, respectivamente.

En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un polipéptido CD3ε humano con una K_D de alrededor de 1 nM a 500 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore.

20 En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3ε humano con una K_D de 250 nM o menor. En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3ε humano con una K_D de 100 nM o menor. En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3ε humano con una K_D de 15 nM o menor. En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3ε
25 humano con una K_D de 10 nM o menor. En algunos aspectos, el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3ε humano con una K_D de 5 nM o menor.

En algunos aspectos, el VH2 comprende las siguientes CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y (c) una CDR-H3 que
30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y el VL2 comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

35 En algunos aspectos, el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; o (c) el anticuerpo comprende a VH2 como en (a) y un VL2 como en (b). En algunos aspectos, el VH2

5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos, el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En algunos aspectos, el VH2 comprende las siguientes CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y (c) una CDR-H3 que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y el VL2 comprende las siguientes CDR: (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51;

15 En algunos aspectos, (a) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; o (c) el anticuerpo comprende a VH2 como en (a) y un VL2 como en (b). En algunos aspectos, el VH2

20 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos, el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.

En algunos aspectos, el VH2 comprende las siguientes FR: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; (c) una FR-H3 que

25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

En algunos aspectos, el VH2 comprende las siguientes FR: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que

30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

En algunos aspectos, el VL2 comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (c) una FR-L3 que

35 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

En algunos aspectos, el VL2 comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (c) una FR-L3 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

En algunos aspectos, cada uno del H1 y H2 comprende además un dominio constante de la cadena pesada (CH1), y cada uno del L1 y L2 comprende además un dominio constante de la cadena liviana (CL). En algunos aspectos, el CH1 de H1 comprende una
10 sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU), y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU). En algunos aspectos, el CH1 de H1 comprende una mutación S183K, y el CL de L1 comprende una mutación V133E. En algunos aspectos, el CH1 de H2 comprende una mutación S183E, y el CL de L2 comprende una mutación V133K. En algunos aspectos, el CH1 de H1 comprende una
15 mutación S183E, y el CL de L1 comprende una mutación V133K. En algunos aspectos, el CH1 de H2 comprende una mutación S183K, y el CL de L2 comprende una mutación V133E.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende: un dominio de unión a
20 LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), en donde cada H1 y H2 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio constante de la cadena pesada (CH1), y cada L1 y L2 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL), en donde: (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 111; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o cualquiera de SEQ ID NO: 99-107; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos
30 de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

5 (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1

10 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat). En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

15 (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a

20 CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).

30

35 En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis

CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 99-107; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1
15 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una
20 sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).

En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una
25 CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia
30 de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de
35 aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de

aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat). En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende: un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), en donde cada H1 y H2

comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio constante de la cadena pesada (CH1), y cada L1 y L2 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL), en donde: (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 111; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ
10 ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o cualquiera de SEQ ID NO: 99-107; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ
15 ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o
20 el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende
25 una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat). En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-
30 H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de
35 aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat). En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 99-107; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).

En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis

CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat). En algunos aspectos, (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (iv) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR: (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de

aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU), y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).

En algunos aspectos, el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en Q39 (numeración de Kabat), y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en Q38 (numeración de Kabat). En algunos aspectos, el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU), y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU). En algunos aspectos, el VH de H2 comprende además una sustitución de aminoácido en la posición Q39 (numeración de Kabat), y el VL de L2 comprende además una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (numeración de Kabat). En algunas formas de realización, el CH1 de H1 comprende una mutación S183K (numeración EU) y el CL de L1 comprende una mutación V133E (numeración EU), y el CH1 de H2 comprende una mutación S183E (numeración EU) y el CL de L2 comprende una mutación V133K (numeración EU). En algunos aspectos, el VH de H1 comprende una mutación Q39E (numeración de Kabat), el VL de L1 comprende una mutación Q38K, el VH de H2 comprende una mutación Q39K, y el VL de L2 comprende una mutación Q38E (numeración de Kabat). En algunas formas de realización, el CH1 de H1 comprende una mutación S183E (numeración EU) y el CL de L1 comprende una mutación V133K (numeración EU), y el CH1 de H2 comprende una mutación S183K (numeración EU) y el CL de L2 comprende una mutación V133E (numeración EU). En algunos aspectos, el VH de H1 comprende una mutación Q39K (numeración de Kabat), el VL de L1 comprende una mutación Q38E (numeración de Kabat), el VH de H2 comprende una mutación Q39E (numeración de Kabat), y el VL de L2 comprende una mutación Q38K (numeración de Kabat).

En algunos aspectos, el VH de H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o el VL de L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. En algunos aspectos, el VH de H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el VL de L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos, el VH de H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o el VL de L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55. En

algunos aspectos, el VH de H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el VL de L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos, cada uno de un primer dominio CH3 (CH3₁) de una región Fc del H1 y un segundo dominio CH3 (CH3₂) de una región Fc del H2 comprende una protuberancia o una cavidad, y en donde la protuberancia o cavidad en el CH3₁ se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el CH3₂. En algunos aspectos, el CH3₁ y el CH3₂ se encuentran en una interfase entre la protuberancia y la cavidad.

En algunos aspectos, el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia y el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad. En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366S, L368A o Y407V (numeración EU), o una combinación de estas; o (c) tanto (a) como (b).

En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b). En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU) y (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU).

En algunos aspectos, el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una cavidad y el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia. En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una cavidad que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366S, L368A o Y407V (numeración EU), o una combinación de estas; (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b). En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU); (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b). En algunos aspectos, (a) el CH3₁ de la región

Fc del H1 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y (b) el CH₃₂ de la región Fc del segundo polipéptido de la cadena pesada comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU).

- 5 En algunos aspectos, las regiones Fc son regiones Fc del isotipo de IgG humana, o variantes de la región Fc de estas. En algunos aspectos, las regiones Fc son variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana. En algunos aspectos, cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende una mutación en el residuo de aminoácido N297 (numeración EU) que produce la ausencia de glucosilación.
- 10 En algunos aspectos, la mutación en el residuo de aminoácido N297 es una mutación por sustitución. En algunos aspectos, la mutación en el residuo de aminoácido N297 reduce la función efectora de la región Fc.
- En algunos aspectos, la mutación por sustitución es una mutación N297G o N297A. En algunos aspectos, cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana
- 15 comprende la mutación N297G. En algunos aspectos, cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende una mutación que reduce la función efectora de la región Fc.
- En algunos aspectos, la mutación que reduce la función efectora de la región Fc es una mutación por sustitución. En algunos aspectos, la mutación por sustitución es un residuo
- 20 de aminoácido E233, L234, L235, D265 y/o P329 (numeración EU). En algunos aspectos, la mutación por sustitución es una mutación E233P, L234A, L234V, L235A, D265A o P329G. En algunos aspectos, cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende la mutación P329G. En algunos aspectos, cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende las mutaciones
- 25 N297G y P329G.
- En algunos aspectos, las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además la mutación L234A o L235A. En algunos aspectos, las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1
- 30 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además las mutaciones L234A y L235A. En algunos aspectos, las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además las siguientes mutaciones por sustitución E233P, L234V y L235A (numeración EU) y una eliminación del residuo G236 (numeración EU). En algunos
- 35 aspectos, las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la

región Fc del isotipo de IgG1 humana.

En algunos aspectos, las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG4 humana, en donde cada una comprende además las siguientes mutaciones por sustitución E233P, F234V y L235A (numeración EU) y una eliminación del residuo G236 (numeración EU).

En algunos aspectos, las regiones Fc del complejo Fc son regiones Fc sin efector.

En algunos aspectos, el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunos aspectos, el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

- 5 En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

- En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1
15 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

- En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

- En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la
35

- cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de
- 5 SEQ ID NO: 57.
- En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la
- 10 cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde: (a) el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; (c) el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y (d) el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.
- 15 En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una depuración posterior a la inyección intravenosa de alrededor de 10 ml/kg/día a alrededor de 35 ml/kg/día.
- En otro aspecto, la divulgación presenta uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, o una porción de este que comprende un dominio de unión que se une a LY6G6D.
- 20 En otro aspecto, la divulgación presenta uno o más vectores que comprenden el uno o más ácidos nucleicos aislados del aspecto anterior.
- En otro aspecto, la divulgación presenta una o más células huésped que comprenden el uno o más vectores del aspecto anterior.
- En algunos aspectos, la una o más células huésped son una o más células huésped de mamífero. En algunos aspectos, la una o más células huésped de mamífero son una o
- 25 más células huésped de ovario de hámster chino (CHO).
- En algunos aspectos, la una o más células huésped son una o más células huésped procariotas. En algunos aspectos, la una o más células huésped procariotas son una o más células huésped de *E. coli*.
- 30 En otro aspecto, la divulgación presenta un método para producir el anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores, en donde el método comprende cultivar la una o más células huésped del aspecto anterior en un medio de cultivo. En algunos aspectos, el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-LY6G6D de la una o más células huésped o del medio de cultivo.
- 35 En otro aspecto, la divulgación presenta una composición que comprende el anticuerpo

de cualquiera de los aspectos anteriores. En algunos aspectos, la composición comprende además un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables. En algunos aspectos, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un amortiguador, portador, estabilizante o conservante. En algunos aspectos, la composición es una
5 composición farmacéutica.

En otro aspecto, la divulgación presenta el anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores para usar como medicamento.

En otro aspecto, la divulgación presenta el anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores o la composición de cualquiera de los aspectos anteriores para usar en el
10 tratamiento o el retraso de la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) de microsatélite estable (MSS) o inestabilidad de microsatélites baja (MSI-L).

15 En otro aspecto, la divulgación presenta el uso del anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores o la composición de cualquiera de los aspectos anteriores en la elaboración de un medicamento para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa
20 LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los
25 aspectos anteriores o la composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L.

En otro aspecto, la divulgación presenta un kit que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y un prospecto del envase que comprende
30 instrucciones para usar el anticuerpo para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal. En algunos aspectos, el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L. En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano.

35 En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a CD3, en

donde el anticuerpo comprende un dominio de unión que comprende las siguientes CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende (a) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; o (c) un VH como en (a) y un VL como en (b). En algunos aspectos, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos, el VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a CD3, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión que comprende las siguientes CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende (a) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; o (c) un VH como en (a) y un VL como en (b). En algunos aspectos, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunos aspectos, el VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.

En algunos aspectos, el VH comprende las siguientes FR: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

En algunos aspectos, el VH comprende las siguientes FR: (a) una FR-H1 que

- comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
- 5 En algunos aspectos, el VL comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
- 10 En algunos aspectos, el VL comprende las siguientes FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
- 15 En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un polipéptido CD3ε humano con una K_D de alrededor de 1 nM a 500 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore. En algunos aspectos, el anticuerpo se une al polipéptido CD3ε humano con una K_D de 250 nM o menor; 100 nM o menor; 15 nM o menor; 10 nM o menor; o 5 nM o menor. En algunos aspectos, el anticuerpo es monoclonal, humano, humanizado o quimérico.
- 20 En algunos aspectos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a CD3. En algunos aspectos, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- 25 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico. En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR): (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27; (b) una CDR-H2 que
- 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 35 En algunos aspectos, el anticuerpo comprende (a) un VH que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (b) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; o (c) un VH como en (a) y un VL como en (b). En algunos aspectos, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En algunos aspectos, el VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

En otro aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1A** es un gráfico que muestra la expresión de LY6G6D y LY6G6F en tejidos normales (negro) y tumorales (rojo) en lecturas normalizadas por millón de kilobases (nRPKM) en The Cancer Genome Atlas (TCGA). LY6G6D se sobreexpresa considerablemente en tejido tumoral del colon.

La **Figura 1B** es un gráfico que muestra la expresión de LY6G6D y LY6G6F en tejidos normales en nRPKM en datos públicos del proyecto GTEx.

La **Figura 1C** es un conjunto de diagramas de caja que muestran la expresión de LY6G6D en nRPKM en tipos de cáncer colorrectal (CRC) que tienen un estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) de microsatélite estable (MSS), inestabilidad de microsatélites baja (MSI-L) o inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H). Se indica la asociación entre el estado de MSI de un CRC y el pronóstico.

La **Figura 2A** es una micrografía de tejido de colon normal que muestra tinción de inmunohistoquímica (IHC) para LY6G6D.

La **Figura 2B** es una micrografía de un tumor de colon primario que muestra tinción de IHC leve (1+) para LY6G6D.

La **Figura 2C** es una micrografía de un tumor de colon primario que muestra tinción de IHC moderada (2+) para LY6G6D.

La **Figura 2D** es una micrografía de un tumor de colon primario que muestra tinción de IHC fuerte (3+) para LY6G6D.

La **Figura 3A** es un par de gráficos que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 (línea celular de carcinoma de colon humano) enriquecido con PBMC humanas 10X de Donante #1 o Donante #2 mediante un anticuerpo biespecífico dependiente de linfocitos T (TDB) LY6G6D que comprende un brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. Se enumeran los valores de EC50 para cada TDB.

La **Figura 3B** es un conjunto de gráficos que muestra volumen tumoral (mm²) de tumores de xenoinjerto HT55 en ratones NSGTM después del tratamiento con un TDB LY6G6D que comprende un brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 40G5c o 38E4v1 anti-CD3. Los ratones se humanizaron con PBMC de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB LY6G6D y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles.

La **Figura 3C** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PBMC humanas mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo 1G4 anti-LY6G6D quimérico o humanizado y un brazo 38E4v1 anti-CD3 y una tabla adjunta que muestra afinidad del brazo 1G4 quimérico o humanizado en un ensayo BIAcore.

La **Figura 3D** es un conjunto de gráficos que muestran volumen tumoral (mm²) de tumores de xenoinjerto HT55 en ratones NSGTM después del tratamiento con un TDB LY6G6D que comprende un brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 anti-CD3. Los ratones se humanizaron con PBMC de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB LY6G6D y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles.

La **Figura 4A** es un diagrama de cinta que muestra la ubicación de sitios de glucosilación modificados por ingeniería genética (círculos en rojo, rosa, verde y azul) en un modelo de homología estructural del polipéptido LY6G6D. Los sitios de glucosilación están codificados por color en función de su efecto en la unión de anticuerpos. La glucosilación en el sitio marcado con el círculo rojo interrumpió la unión de 1G4. La glucosilación en el sitio marcado con el círculo rosa interrumpió la unión de 16D7. La glucosilación en los sitios marcados con círculos azules no interrumpió la unión de 1G4 o 16D7. El círculo verde marca un sitio de glucosilación modificado por ingeniería genética en el ligador a Fc.

La **Figura 4B** es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos anti-LY6G6D candidatos a polipéptidos LY6G6D que comprenden sitios de glucosilación modificados por ingeniería genética en los residuos indicados. Las células marcadas con una X indican que no se detectó unión. Las células marcadas con una W indican que la unión se redujo considerablemente.

La **Figura 4C** es un par de diagramas que muestran la ubicación de sitios de glucosilación modificados por ingeniería genética en un modelo de homología estructural del polipéptido LY6G6D en una primera orientación y una segunda orientación que se rotó 180 °. Los sitios de glucosilación que interrumpieron la unión de

los anticuerpos de los Grupos 1, 2, 3 y 4 de la Figura 4A se indican mediante círculos en verde, violeta, azul y naranja, respectivamente.

La **Figura 4D** es una secuencia de polipéptido LY6G6D anotada en donde los residuos de aminoácidos afectados por mutaciones de glucosilación están codificados por color como en la Figura 4C y los Grupos 1, 2, 3 y 4 de la Figura 4A se indican mediante subrayado.

La **Figura 4E** es un diagrama que muestra clones de anticuerpo anti-LY6G6D de conejo ubicados en cuatro grupos de epítomos distintos. El Grupo 1 incluye tres grupos de secuencias e incluye 20A12, rf.1G4, 6E10 y 4H7. El Grupo 2 incluye seis grupos de secuencias e incluye f.16D7. Cada uno de los Grupos 3 y 4 incluye tres grupos de secuencias.

La **Figura 4F** es un gráfico que muestra la unión de TDB de conejo anti-LY6G6D humano que comprenden el brazo anti-LY6G6D indicado del Grupo 1, 2, 3 o 4 de la Figura 4E y el brazo 40G5c anti-CD3 a células HT55 (línea de células de carcinoma de colon humano). La unión se mide como intensidad de fluorescencia media (MFI).

La **Figura 4G** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PBMC humanas mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D del Grupo 1, 2, 3 o 4 de la Figura 4E y el brazo 40G5c anti-CD3.

La **Figura 4H** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de 1G4 y los anticuerpos anti-LY6G6D de conejo 6E10, 20A12 y 4H7 a un polipéptido Ly6G6D según se midió mediante un ensayo BIAcore. Los anticuerpos de conejo se expresaron como fragmentos de unión al antígeno (Fab) quiméricos con dominios variables de conejo y dominios constantes humanos. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el Fab se hizo fluir de manera continua a 37 °C. La KD se indica debajo de cada gráfico.

La **Figura 5A** es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 20A12.QNTv12 (de dos células) (SEQ ID NO: 22) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR H1, CDR H2 y CDR H3. Las secuencias de CDR de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat se subrayan.

La **Figura 5B** es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 20A12.QNTv12 (de dos células) (SEQ ID NO: 23) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Se indican las CDR CDR H1, CDR H2 y CDR H3. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 5C** es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 20A12.QNTv12 (de una célula) que comprende una

mutación por sustitución de aminoácido Q39E (dentro de recuadro) en la región estructural (FR) 2 (SEQ ID NO: 10). Esta secuencia de la región variable de la cadena pesada es particularmente útil para la elaboración de célula única de TDB. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR H1, CDR H2 y CDR H3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 5D** es un diagrama que muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 20A12.QNTv12 (de una célula) que comprende una mutación Q38K (dentro de recuadro) en FR2 (SEQ ID NO: 11). Esta secuencia de la región variable de la cadena liviana es particularmente útil para la elaboración de célula única de TDB. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR H1, CDR H2 y CDR H3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 6A** es un modelo de estructura de proteína que muestra el fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D (RDCYLGDLCN; SEQ ID NO: 78).

La **Figura 6B** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra diez complejos superpuestos que comprenden el Fab del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. 20A12.QNTv12 se muestra como un diagrama de cinta. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas, y los residuos de aminoácidos se etiquetan.

La **Figura 6C** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra la cadena pesada (HC; rosa) y cadena liviana (LC; verde) del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas, y los residuos de aminoácidos se etiquetan.

La **Figura 6D** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra la HC (rosa) y LC (verde) del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas con un mapa de densidad de electrones 2Fo-Fc con contorno en $1,0\sigma$ (azul).

La **Figura 6E** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra el anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. La CDR H1, CDR H2 y CDR H3 (H1, H2 y H3, respectivamente) de la región variable de la

cadena pesada de 20A12.QNTv12 y la CDR L1, CDR L2 y CDR L3 (L1, L2 y L3, respectivamente) de la región variable de la cadena liviana de 20A12.QNTv12 están etiquetados y se indican con un color en un modelo de cinta. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas.

5 La **Figura 6F** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra el anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. 20A12.QNTv12 se muestra como un modelo de espacio lleno. La CDR H1, CDR H2 y CDR H3 (H1, H2 y H3, respectivamente) de la región variable de la cadena pesada de 20A12.QNTv12 y la CDR L1, CDR L2 y CDR L3 (L1, L2 y L3, respectivamente) de la
10 región variable de la cadena liviana de 20A12.QNTv12 están etiquetados. Los residuos seleccionados de 20A12.QNTv12 están etiquetados, y las interacciones entre 20A12.QNTv12 y el polipéptido LY6G6D se indican con líneas punteadas en rojo. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas.

15 La **Figura 7A** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra el anticuerpo 1G4 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. La CDR H1, CDR H2 y CDR H3 de la región variable de la cadena pesada de 1G4 y la CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de la región variable de la cadena liviana de 1G4 están etiquetados y se indican con un color en un modelo de cinta. El polipéptido que comprende los residuos
20 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas.

La **Figura 7B** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra el anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a los residuos de aminoácidos 94-103 de LY6G6D. La CDR H1, CDR H2 y CDR H3 de la región variable de la cadena pesada de 20A12.QNTv12 y la CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de la región variable de la cadena liviana
25 de 20A12.QNTv12 están etiquetados y se indican con un color en un modelo de cinta. El polipéptido que comprende los residuos 94-103 de LY6G6D se muestra como un diagrama de líneas.

La **Figura 7C** es un modelo de estructura de proteína que muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 96) y la cadena liviana (SEQ ID NO: 97) del fragmento de región de unión
30 al antígeno (Fab) del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 93-104 de LY6G6D (HRDCYLGDLNCS; SEQ ID NO: 87) y un diagrama de secuencia de los residuos 93-104 de LY6G6D que muestran los residuos específicos con los que interactúa 20A12.QNTv12 (en naranja y subrayados). Cada uno de estos residuos se posiciona dentro de 5 Å del Fab.

35 La **Figura 7D** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra la

cadena pesada (SEQ ID NO: 96) y la cadena liviana (SEQ ID NO: 97) del fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 93-104 de LY6G6D (HRDCYLGLDLCNS; SEQ ID NO: 87). Los residuos en 20A12.QNTv12 que interactúan con el polipéptido LY6G6D están etiquetados. ^{HC} indica que el residuo está en la cadena pesada de 20A12.QNTv12; ^{LC} indica que el residuo está en la cadena liviana de 20A12.QNTv12.

La **Figura 7E** es un modelo de estructura de proteína que muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 94) y la cadena liviana (SEQ ID NO: 95) del fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 1G4 unido a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 93-104 de LY6G6D (HRDCYLGLDLCNS; SEQ ID NO: 87) y un diagrama de secuencia de los residuos 93-104 de LY6G6D que muestran los residuos específicos con los que interactúa 1G4 (en naranja y subrayados). Cada uno de estos residuos se posiciona dentro de 5 Å del Fab.

La **Figura 7F** es una región de un modelo de estructura de proteína que muestra la cadena pesada (SEQ ID NO: 94) y la cadena liviana (SEQ ID NO: 95) del fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 1G4 unido a un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 93-104 de LY6G6D (HRDCYLGLDLCNS; SEQ ID NO: 87). Los residuos en 1G4 que interactúan con el polipéptido LY6G6D están etiquetados. ^{HC} indica que el residuo está en la cadena pesada de 1G4; ^{LC} indica que el residuo está en la cadena liviana de 1G4.

La **Figura 8A** es un diagrama esquemático que muestra la elaboración de un TDB de LY6G6D que tiene un brazo 38E4v1 anti-CD3 que comprende una región Fc que tiene mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V que forman una región “ojal” y una mutación N297G, emparejada con un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) que comprende una región Fc que tiene una mutación T366W de sustitución de aminoácido que forma una región “botón” y una mutación N297G, en donde el brazo anti-CD3 y el brazo anti-LY6G6D forman un TDB de IgG1_K de longitud completa.

La **Figura 8B** es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo para elaborar un anticuerpo biespecífico usando dos líneas de células huésped (tecnología de dos células). Un primer brazo del anticuerpo que comprende una región de ojal se produce en una primera línea de células huésped, y un segundo brazo del anticuerpo que comprende una región de botón se produce en una segunda línea de células huésped. Los brazos del anticuerpo se purifican de las líneas de células huésped y se ensamblan *in vitro*.

La **Figura 8C** es un diagrama esquemático que muestra un flujo de trabajo para elaborar un anticuerpo biespecífico usando una única línea de célula huésped (tecnología de una célula). Un primer brazo del anticuerpo que comprende una región de ojal y un segundo brazo del anticuerpo que comprende una región de botón se producen en y se purifican de una sola línea de células huésped. El primer brazo y segundo brazo del anticuerpo comprenden mutaciones por sustitución de aminoácidos como se muestra en la Figura 8D o Figura 8E.

La **Figura 8D** es un diagrama que muestra un anticuerpo biespecífico producido usando una única línea celular. Se indican las mutaciones por sustitución de aminoácidos que introducen pares de carga. Los pares de carga comprenden una mutación por sustitución Q39K en el VH del primer brazo y una mutación por sustitución Q38E en el VL del primer brazo; una mutación por sustitución S183E en el CH1 del primer brazo y una mutación por sustitución V133K en el CL del primer brazo; una mutación por sustitución Q39E en el VH del segundo brazo y una mutación por sustitución Q38K en el VL del segundo brazo; y una mutación por sustitución S183K en el CH1 del segundo brazo y una mutación por sustitución V133E en el CL del segundo brazo.

La **Figura 8E** es un diagrama que muestra un anticuerpo biespecífico producido usando una única línea celular. Se indican mutaciones por sustitución de aminoácidos. Se indican las mutaciones por sustitución de aminoácidos que introducen pares de carga. Los pares de carga comprenden una mutación por sustitución Q39E en el VH del primer brazo y una mutación por sustitución Q38E en el VL del primer brazo; una mutación por sustitución Q39K en el VH del segundo brazo y una mutación por sustitución Q38E en el VL del segundo brazo; y una mutación por sustitución S183E en el CH1 del segundo brazo y una mutación por sustitución V133K en el CL del segundo brazo. El anticuerpo comprende además las mutaciones de YT65 de Rosetta A141I, F170S, S181M, S183A y V185A en el CH1 del primer brazo y las mutaciones F116A, L135V, S174A, S176F y T178V en el CL del primer brazo.

La **Figura 9A** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®. El TDB se proporcionó en concentraciones de 0,01 a 10.000 ng/ml.

La **Figura 9B** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD4+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD4+

se midió usando separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

La **Figura 9C** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 10A** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.v1 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, o el brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®. El TDB se proporcionó en concentraciones de 0,01 a 10.000 ng/ml.

La **Figura 10B** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de células CD4 mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.v1 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, o el brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD4+ se midió usando FACS.

La **Figura 10C** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.v1 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, o el brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 10D** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, el brazo 20A12.SNVv12 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3, o el brazo 6E10.v23 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®.

La **Figura 11A** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células Colo320DM, HT55, y LS1034 mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 anti-CD3. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®.

La **Figura 11B** es un conjunto de gráficos que muestra la capacidad de unión al antígeno de un TDB LY6G6D que comprende un brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 anti-CD3 a las células Colo320DM, HT55 y LS1034 según se midió mediante FACS.

La **Figura 11C** es un conjunto de micrografías que muestra la tinción de IHC en pelets celulares y en muestras de xenoinjerto tumoral.

La **Figura 11D** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PBMC humanas de un donante sano mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3 o el brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3 después de 24 horas.

La **Figura 11E** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PBMC humanas de un donante sano mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3 o el brazo 1G4 anti-LY6G6D y un brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3 después de 48 horas. La K_D para cada TDB se indica entre paréntesis.

La **Figura 11F** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PBMC humanas de diez donantes mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 anti-CD3.

La **Figura 11G** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 anti-CD3. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 11H** es una tabla que muestra los valores de EC50 para inactivación celular y activación de linfocitos T CD8+ para diez donantes de PBMC.

La **Figura 11I** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 anti-CD3 en células Colo320DM, HT55 y LS1034. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm^2) de tumores de xenoinjerto COLO320DM en ratones después del tratamiento con un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 38E4.v1 anti-CD3. Los ratones se humanizaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles.

La **Figura 13A** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD4+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D rb6E, rb11A11,

rb5D3, rb7F2, rb20F12, rb20A12, rb5E4, rb3A4, rb17F11, rb4H7, rb3D3, o 1G4 humanizado y el brazo 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD4+ se midió usando FACS.

5 **La Figura 13B** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D rb6E, rb11A11, rb5D3, rb7F2, rb20F12, rb20A12, rb5E4, rb3A4, rb17F11, rb4H7, rb3D3, o 1G4 humanizado y el brazo 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

10 **La Figura 13C** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PMBC del Donante #2 mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D rb6E, rb11A11, rb5D3, rb7F2, rb20F12, rb20A12, rb5E4, rb3A4, rb17F11, rb4H7, rb3D3, o 1G4 humanizado y el brazo 40G5c anti-CD3. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®.

15 **La Figura 13D** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD4+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D rb6E, rb11A11, rb5D3, rb7F2, rb20F12, rb20A12, rb5E4, rb3A4, rb17F11, rb4H7, rb3D3, o 1G4 humanizado y el brazo 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD4+ se midió usando FACS.

20 **La Figura 13E** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante un TDB LY6G6D que comprende un brazo anti-LY6G6D rb6E, rb11A11, rb5D3, rb7F2, rb20F12, rb20A12, rb5E4, rb3A4, rb17F11, rb4H7, rb3D3, o 1G4 humanizado y el brazo 40G5c anti-CD3. La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

25 **La Figura 14A** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PMBC del Donante #1 mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). Los residuos específicos en MD2, MD3 y MD4 que se mutaron con respecto a la secuencia de 38E4.v1 WT se indican entre paréntesis. La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®.

35 **La Figura 14B** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD4+ mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que

comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1,
5 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). La activación de linfocitos T CD4+ se midió usando FACS.

La **Figura 14C** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB LY6G6D
10 ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 15A** es un gráfico que muestra la inactivación *in vitro* de células HT55 enriquecidas con PMBC del Donante #2 mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende
20 el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). La inactivación se cuantificó como % de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®.

La **Figura 15B** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD4+ mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB LY6G6D
25 ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). La activación de linfocitos T CD4+ se midió usando FACS.

La **Figura 15C** es un gráfico que muestra la activación *in vitro* de linfocitos T CD8+ mediante TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3 o 38E4.v1 (WT) y mediante TDB LY6G6D
35 ensamblados usando un sistema de una célula y que comprende el brazo

20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4.v1 MD1, 38E4.v1 MD2, 38E4.v1 MD3, 38E4.v1 MD4 o 38E4.v1 (WT). La activación de linfocitos T CD8+ se midió usando FACS.

La **Figura 16A** es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm²) de tumores de xenoinjerto LS1034 en ratones NSGTM después del tratamiento con un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 40G5c o 38E4.v1 anti-CD3. Los ratones se humanizaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB LY6G6D y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles. “3+” indica el puntaje de IHC de LY6G6D de la línea celular.

La **Figura 16B** es un gráfico que muestra la concentración sérica (en µg/ml) de los TDB LY6G6D que comprenden el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 40G5c o 38E4.v1 anti-CD3 en ratones NSGTM LS1034 después de la administración de una única dosis de TDB.

La **Figura 16C** es un conjunto de gráficos que muestra datos sin procesar para el ensayo de volumen tumoral que se muestra en la Figura 16A.

La **Figura 17A** es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm²) de tumores de xenoinjerto HT55 en ratones NSGTM después del tratamiento con un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 40G5c o 38E4.v1 anti-CD3. Los ratones se humanizaron con PBMC de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles. “2+” indica el puntaje de IHC de LY6G6D de la línea celular.

La **Figura 17B** es un conjunto de gráficos que muestra datos sin procesar para el ensayo de volumen tumoral que se muestra en la Figura 17A.

La **Figura 17C** es un gráfico que muestra la concentración sérica (en µg/ml) de los TDB LY6G6D que comprenden el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 40G5c o 38E4.v1 anti-CD3 en ratones NSGTM HT55 después de la administración de una única dosis de TDB, según se midió usando un ELISA farmacocinético de inmunoglobulina genérico (GRIP).

La **Figura 18** es un gráfico y una tabla que muestra la concentración sérica (en µg/ml) de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y un brazo 40G5c o 38E4.v1 anti-CD3 y un anticuerpo B56 anti-gD en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) después de la administración

intravenosa de una dosis única de 5 mg/kg del anticuerpo. C_{max} : concentración sérica máxima; AUC_{0-28} : área bajo la curva; CL: tasa de depuración; $t_{1/2}$: semivida.

La **Figura 19** es un diagrama esquemático y una tabla que muestra un estudio de toxicidad para un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en *Macaca fascicularis*.

La **Figura 20A** es un gráfico que muestra la concentración sérica (en $\mu\text{g/ml}$) de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en *Macaca fascicularis* después de la administración intravenosa de una única dosis de TDB en las cantidades indicadas.

La **Figura 20B** es un gráfico y una tabla que muestran la concentración sérica (en $\mu\text{g/ml}$) y depuración (CL) de los TDB que comprenden diversos brazos que actúan sobre tumores emparejados con el brazo 38E4v1 o 405Gc anti-CD3 en *Macaca fascicularis* después de la administración intravenosa de una única dosis de 1 mg/kg del TDB.

La **Figura 21** es un conjunto de micrografías que muestran infiltrados mononucleares perivasculares/vasculares en el cerebro del Animal N.º 6003, que recibió una dosis de TDB LY6G6D que comprendía el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 a 15 mg/kg. El panel izquierdo superior muestra un vaso meníngeo de control (normal). El panel izquierdo inferior muestra un vaso meníngeo anormal del Animal N.º 6003. El panel derecho muestra una vista ampliada del vaso meníngeo anormal.

La **Figura 22A** es un conjunto de gráficos que muestra la concentración de las citocinas G-CSF, IL-1Ra, MCP-1, TNF- α , IL-13 e IL-8 (en pg/ml) después del tratamiento de *Macaca fascicularis* con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar).

La **Figura 22B** es un gráfico de dispersión que muestra la concentración de proteína C reactiva (CRP; en pg/ml) después del tratamiento de *Macaca fascicularis* con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar).

La **Figura 23A** es un par de gráficos que muestra el porcentaje de células que se seleccionaron como linfocitos T colaboradores (Th) que expresan CD25 CD3+/CD4+/CD5+ (panel izquierdo) y linfocitos T citotóxicos (Tc) que expresan CD25 CD3+/CD8+/CD5+ (panel derecho) en un ensayo de citometría de flujo en *Macaca fascicularis* tratados con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo

20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar). Las mediciones se tomaron 7 días antes del tratamiento (Día -7) y el día del tratamiento (Día 1 Pre) y se promediaron (promedio predosis). Después de terminar la infusión (EOI), se tomaron mediciones a las 2 horas, 6 horas, 24 horas y 168 horas. Un pico que muestra activación leve de linfocitos T está etiquetado con una flecha.

La **Figura 23B** es un gráfico que muestra el porcentaje de células que se seleccionaron como linfocitos T CD45+/CD3+ en un ensayo de citometría de flujo en *Macaca fascicularis* tratados con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar). Un pico que muestra recuperación de linfocitos T está etiquetado con una flecha.

La **Figura 23C** es un gráfico que muestra el porcentaje de células que se seleccionaron como linfocitos B CD45+/CD20+ en un ensayo de citometría de flujo en *Macaca fascicularis* tratados con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar). Un pico que muestra recuperación de linfocitos B está etiquetado con una flecha.

La **Figura 23D** es un gráfico que muestra el porcentaje de células que se seleccionaron como células *natural killer* (NK) CD45+/CD16+ en un ensayo de citometría de flujo en *Macaca fascicularis* tratados con una única dosis de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 en las dosis indicadas y en *Macaca fascicularis* de control (sin tratar).

La **Figura 24A** es un par de gráficos que muestra la unión de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 contra un polipéptido Ly6G6D humano (panel izquierdo) y de *Macaca fascicularis* (panel derecho) según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 24B** es un par de gráficos que muestra la unión de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 40G5c anti-CD3 contra un polipéptido Ly6G6D humano (panel izquierdo) y de *Macaca fascicularis* (panel derecho) según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 24C** es un par de gráficos que muestra la unión de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 1G4 anti-LY6G6D y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 contra un polipéptido Ly6G6D humano (panel izquierdo) y de *Macaca fascicularis* (panel derecho) según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 24D** es un par de gráficos que muestra la unión de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 1G4 anti-LY6G6D y el brazo 40G5c anti-CD3 contra un polipéptido Ly6G6D humano (panel izquierdo) y de *Macaca fascicularis* (panel derecho) según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 25** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de un TDB LY6G6D que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4.v1 anti-CD3 (panel izquierdo), el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y el brazo 38E4.v1 MD1 anti-CD3 (panel central), o el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y el brazo 38E4.v1 MD4 anti-CD3 (panel derecho) contra un polipéptido Ly6G6D humano según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 26A** es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm²) de tumores de xenoinjerto HT55 en ratones NSGTM después del tratamiento con un TDB LY6G6D ensamblado usando un sistema de una célula que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo anti-CD3 38E4v1 MD1, 38E4v1 MD4 o 38E4v1 (WT) y mediante un TDB LY6G6D ensamblado usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 (WT) anti-CD3. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB y que no comprenden PMBC se proporcionan como controles.

La **Figura 26B** es un conjunto de gráficos que muestra datos sin procesar para el ensayo de volumen tumoral que se muestra en la Figura 26A.

La **Figura 27** es un gráfico que muestra la concentración sérica (en µg/ml) de un TDB LY6G6D ensamblado usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 (WT) anti-CD3 y los TDB LY6G6D ensamblados usando un sistema de una célula que comprenden el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo 38E4v1 MD1 o 38E4v1 MD4 anti-CD3.

La **Figura 28** es un gráfico y una tabla que muestra la concentración sérica (en µg/ml)

de un TDB LY6G6D ensamblado usando un sistema de una célula que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de una célula) y un brazo 38E4v1 MD1 o 38E4v1 MD4 anti-CD3 y un TDB LY6G6D ensamblado usando un sistema de dos células y que comprende el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D (de dos células) y el brazo 38E4v1 (WT) anti-CD3.

La **Figura 29A** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos del VL de los clones anti-CD3 38E4v1, 40G5c, 38E4v1 MD1 (MD1) y 38E4v1 MD4 (MD4). Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 29B** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos del VH de los clones anti-CD3 38E4v1, 40G5c, 38E4v1 MD1 (MD1) y 38E4v1 MD4 (MD4). Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 29C** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de producción de transfección transitoria que incluye los brazos anti-CD3 38E4v1, MD1, 38E4v1.S43P, 38E4v1.T51A, 38E4v1.K55E y 38E4v1.K89T.

La **Figura 29D** es un gráfico que muestra el porcentaje de anticuerpos biespecíficos adecuadamente emparejados producidos para los TDB LY6G6D que comprenden un brazo anti-LY6G6D o un brazo anti-FcRH5 y un brazo anti-CD3 38E4v1 (WT), MD1 o variantes de brazos 38E4v1 que tienen sustituciones de aminoácidos únicos (indicadas entre paréntesis) en diferentes relaciones del ADN de la cadena liviana (LC) del brazo diana con respecto al ADN del brazo anti-CD3 (LC de brazo diana:LC de CD3).

La **Figura 29E** es un gráfico que muestra la concentración sérica (en µg/ml) después de la administración de una única dosis de 5 mg/kg de un anticuerpo anti-CD3 monoespecífico y bivalente que comprende el brazo anti-CD3 38E4v1, 40G5c, MD1, MD4 o 38E4v1 K55E a los ratones SCID CB-17 (n=3 por punto temporal). Un anticuerpo anti-gD se muestra como control. Los puntos de datos individuales (símbolos) se muestran junto con valores medios conectados (líneas sólidas).

La **Figura 29F** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos del VL de los clones anti-CD3 38E4v1, 40G5c, MD1 y MD4 que comprende una mutación por sustitución de aminoácido Q38E (dentro de recuadro) en la región estructural (FR) 2. Esta secuencia de la región variable de la cadena liviana es particularmente útil para la elaboración de célula única de TDB. Se indican las regiones

determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 29G** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos del VH de los clones anti-CD3 38E4v1, 40G5c, MD1 y MD4 que comprende una mutación por sustitución de aminoácido Q39K (dentro de recuadro) en la región estructural (FR) 2. Esta secuencia de la región variable de la cadena pesada es particularmente útil para la elaboración de célula única de TDB. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3 de acuerdo con las definiciones de contacto, Chothia y Kabat. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat se subrayan.

La **Figura 30** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de producción de transfección transitoria para dos réplicas de elaboración del brazo 1G4 anti-LY6G6D. El brazo anti-CD3 38E4v1 y un brazo anti-GFR1 se proporcionan como controles.

La **Figura 31A** es un diagrama de la cadena liviana (LC) y la cadena pesada (HC) del clon de conejo 20A12 que muestra un sitio de glucosilación en la CDR-L3 y un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína de la CDR-H1 y la CDR-L2.

La **Figura 31B** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de variantes del brazo anti-LY6G6D 20A12 que comprenden las CDR 20A12 de conejo y las regiones estructurales de cadena liviana humanas de hIGKV.1-5, hIGKV.1-39 y hIGKV.4-1, y las regiones estructurales de cadena pesada humanas de hIGHV.3-23 y hIGHV.3-30 según se midió mediante un ensayo BIAcore. Se muestra el porcentaje de identidad de la secuencia de la línea germinal humana con la secuencia rb.20A12 y el número de posiciones Vernier en cada variante.

La **Figura 31C** es una tabla que muestra el porcentaje de identidad de diversas secuencias de la línea germinal VL humanas con la secuencia rb.20A12; el número de posiciones Vernier en cada secuencia de la línea germinal humana; y la prevalencia de la secuencia de la línea germinal en seres humanos.

La **Figura 31D** es una tabla que muestra el porcentaje de identidad de diversas secuencias de la línea germinal VH humanas con la secuencia rb.20A12; el número de posiciones Vernier en cada secuencia de la línea germinal humana; y la prevalencia de la secuencia de la línea germinal en seres humanos.

La **Figura 32A** es un diagrama de la cadena liviana (LC) y la cadena pesada (HC) del clon de conejo 20A12 que muestra un sitio de glucosilación en la CDR-L3 y un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína de la CDR-H1 y la CDR-L2.

La **Figura 32B** es un diagrama de la LC y HC de la variante de 20A12 humanizada 20A12.v1 que muestra un sitio de glucosilación en la CDR-L3 y las mutaciones por sustitución de aminoácidos C35S y C50A que eliminan un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína de la CDR-H1 y la CDR-L2. 20A12.v1 comprende las regiones

5 estructurales VH de hIGHV.3-23 y las regiones estructurales VL de hIGKV.1-39. Las regiones estructurales humanas se modificaron en nueve posiciones (círculos) para comprender residuos Vernier derivados de la secuencia de conejo 20A12.

La **Figura 32C** es un diagrama de la LC y HC de la variante de 20A12 humanizada pulida que muestra un sitio de glucosilación en la CDR-L3 y las mutaciones por sustitución de aminoácidos C35S y C50A que eliminan un enlace de disulfuro entre dos

10 residuos de cisteína de la CDR-H1 y la CDR-L2. La variante de 20A12 pulida comprende las regiones estructurales VH de hIGHV.3-23 y las regiones estructurales VL de hIGKV.1-5. Las regiones estructurales humanas se modificaron en cuatro posiciones (círculos) para comprender residuos Vernier derivados de la secuencia de conejo

15 20A12.

La **Figura 32D** es un par de diagramas y una tabla que muestra la KD para rb.20A12 y diversas variantes humanizadas de esta. La columna central indica mutaciones por sustitución de aminoácidos con respecto a las secuencias de la cadena pesada (H) de la región estructural humana de hIGHV.3-23 y las secuencias de la cadena liviana (L)

20 de la región estructural humana que revierten la posición de aminoácido a un residuo Vernier de conejo.

La **Figura 33A** es una tabla que muestra el porcentaje de identidad de diversas secuencias de la línea germinal VL humanas con la secuencia rb.6E10; el número de posiciones Vernier en cada secuencia de la línea germinal humana; y la prevalencia de la secuencia de la línea germinal en seres humanos.

25

La **Figura 33B** es una tabla que muestra el porcentaje de identidad de diversas secuencias de la línea germinal VH humanas con la secuencia rb.6E10; el número de posiciones Vernier en cada secuencia de la línea germinal humana; y la prevalencia de la secuencia de la línea germinal en seres humanos.

La **Figura 34A** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de rb.20A12 y una variedad de Fab quiméricos que tienen dominios variables de rb.20A12 y regiones constantes humanos a un polipéptido Ly6G6D, según se midió mediante un ensayo BIAcore. Cada uno de los Fab quiméricos comprende mutaciones de aminoácidos en cada uno de C35 de CDR-H1 y C50 de CDR-H2), de la siguiente manera: C35S-C50A

30 (SA), C35S-C50S (SS), C35I-C50A (IA), C35I-C50S (IS) y C35I-C50I (II). Se indica la

35

KD para cada Fab quimérico.

La **Figura 34B** es un diagrama de secuencia que muestra un sitio de glucosilación en la CDR-L3 de rb.20A12 que tiene la secuencia NNT y una tabla que muestra la KD de variantes de la secuencia de cadena liviana 20A12 humanizada pulida descrita anteriormente que tiene mutaciones por sustitución de aminoácidos en el sitio de glucosilación, según se midió mediante un ensayo BIAcore para determinar la unión a LY6G6D.

La **Figura 34C** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de variantes Fab de 20A12 de conejo, 20A12 de conejo que comprende las mutaciones C35I y C50A (IA), y la 20A12 humanizada pulida que tiene mutaciones por sustitución de aminoácidos QNT en el sitio de glucosilación de la Figura 34B a LY6G6D, según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se capturó en un chip de proteína A, y el Fab se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 34D** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de variantes Fab de la secuencia de la cadena liviana 20A12 humanizada pulida que tiene las mutaciones por sustitución de aminoácidos QNV, SNV, GNT y SNA en el sitio de glucosilación de la Figura 34B a un polipéptido Ly6G6D, según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se capturó en un chip de proteína A, y el Fab se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 35A** es un diagrama que muestra la 20A12 de conejo de la Figura 32A y un gráfico que muestra la unión del anticuerpo diagramado a LY6G6D, según se midió mediante un ensayo BIAcore.

La **Figura 35B** es un diagrama que muestra la variante de 20A12 humanizada pulida 20A12.QNTv12 y un gráfico que muestra la unión del anticuerpo diagramado a LY6G6D, según se midió mediante un ensayo BIAcore.

La **Figura 36** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de 20A12.QNTv12, 6E10.v114 y 1G4 a polipéptidos LY6G6D humanos y de *Macaca fascicularis* y una tabla que resume la KD para cada ensayo, según se midió mediante un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C.

La **Figura 37** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de producción de transfección transitoria para los brazos anti-LY6G6D 20A12.QNTv.1 y 20A12.QNTv12. El brazo anti-CD3 38E4v1 y un brazo anti-FGFR1 se proporcionan como controles.

La **Figura 38** es una tabla que muestra los resultados de un ensayo ELISA de baculovirus (BV) para depuración no específica para el brazo 20A12.QNTv12

(20A12.ver1.polished) anti-LY6G6D.

La **Figura 39** es una tabla que muestra los resultados de análisis de evaluación molecular (MA) de TDB que comprenden el brazo 20A12.QNTv12 anti-LY6G6D y el brazo 38E4v1 o 40G5c anti-CD3. El color verde indica ensayos para los cuales no se

5 identificaron conflictos aparentes.

La **Figura 40A** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de variantes humanizadas de 20A12 que comprende las CDR de rb.20A12 y las regiones estructurales VH de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-23 o hIGHV.3-30 y las regiones estructurales VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.1-5, hIGKV.1-39 o hIGKV.4-1, en donde cada una tiene residuos Vernier de conejo. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

10 La **Figura 40B** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de rb.20A12 y las variantes humanizadas 20A12.QNTv.1 y 20A12.QNTv12. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

La **Figura 40C** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de VH de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-23, la VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.1-5 y la VH y VL de las variantes de 20A12 humanizadas 20A12.QNTv.1 y 20A12.QNTv12. Los residuos de Vernier de conejo presentes en 20A12.QNTv.1 y 20A12.QNTv12 se indican mediante óvalos. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

20 La **Figura 41** es una tabla que muestra los resultados de análisis de evaluación molecular (MA) del Fab 6E10v1. El color verde indica ensayos para los cuales no se identificaron conflictos aparentes; el color rojo indica que se identificaron conflictos.

La **Figura 42** es un conjunto de gráficos que muestra la unión de variantes del brazo anti-LY6G6D 6E10 que comprende las CDR 6E10 de conejo y las regiones estructurales VH de las secuencias de la línea germinal humana hIGHV.3-53, hIGHV.4-4 o hIGHV.3-48 y las regiones estructurales VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.1-5, hIGKV.3-20 o hIGKV.4-1, según se midió mediante un ensayo BIAcore. Se muestra el número de posiciones Vernier en cada variante.

30 La **Figura 43A** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de variantes humanizadas de 6E10 que comprende las CDR de rb.6E10 y

las regiones estructurales VH de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-53, hIGHV.4-4 o hIGHV.3-48 y las regiones estructurales VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.1-5, hIGKV.3-20 o hIGKV.4-1. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los
5 residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

La **Figura 43B** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de rb.6E10 y las variantes humanizadas 6E10.v23 y 6E10.v114. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

10 La **Figura 43C** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de VH de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-53*01, la VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-20*01 y la VH y VL de rb.6E10 y la variante de 6E10 humanizada 6E10.v114. Los residuos de Vernier de conejo presentes en rb.6E10 y 6E10.v114 se indican mediante óvalos. Se indican las regiones
15 determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

La **Figura 43D** es una alineación de secuencias que muestra las secuencias de aminoácidos de VH de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.3-48*01, la VL de la secuencia de la línea germinal humana hIGHV.1-5*01 y la VH y VL de rb.6E10 y
20 la variante de 6E10 humanizada 6E10.v23. Los residuos de Vernier de conejo presentes en rb.6E10 y 6E10.v23 se indican mediante óvalos. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) CDR L1, CDR L2 y CDR L3. Los residuos que difieren entre las secuencias están resaltados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

25 I. DEFINICIONES

Como se usa en la presente, la expresión “alrededor de” se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo conocido por la persona del oficio de nivel medio en este campo técnico. La referencia a “alrededor de” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) aspectos que se refieren a ese valor o parámetro *per se*.

30 Cabe destacar que los aspectos de la invención descritos en la presente incluyen “que comprende”, “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” aspectos.

La expresión “Ly6G6D” o “complejo 6 del antígeno linfocítico, locus G61”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier Ly6G6D nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por
35 ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, y abarca Ly6G6D sin procesar “de longitud completa”, así como cualquier forma de Ly6G6D que surge como

resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de Ly6G6D, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Ly6G6D también se denomina G6D, Ly6-D, C6orf23, transcripto del gen mejorado por megacariocitos 1 (MEGT1) y NG25, y se divulga en la patente estadounidense N.º 7.951.546, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad, como TAT201, con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y una secuencia de nucleótidos, DNA234441, de SEQ ID NO: 76. Ly6G6D incluye, por ejemplo, la proteína Ly6G6D humana (NCBI RefSeq N.º NP_067079.2), que tiene 133 aminoácidos de longitud.

Las expresiones “anticuerpo anti-LY6G6D” y “un anticuerpo que se une a LY6G6D” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a LY6G6D con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para actuar sobre LY6G6D. En una forma de realización, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-LY6G6D a una proteína no-LY6G6D no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a LY6G6D según se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a LY6G6D tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 250 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 6 \text{ nM}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D se une a un epítipo de LY6G6D que se conserva entre LY6G6D de diferentes especies. Como se usa en la presente, la expresión “grupo de diferenciación 3” o “CD3”, hace referencia a cualquier CD3 nativo de cualquier origen vertebrado, incluidos los mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo, lo que incluye, por ejemplo, las cadenas de CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 α y CD3 β . La expresión abarca CD3 “de longitud completa” y sin procesar (por ejemplo, CD3 ϵ o CD3 γ sin procesar o sin modificar), así como cualquier forma de CD3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de CD3, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3 ϵ humana (NCBI RefSeq N.º NP_000724), que tiene una longitud de 207 aminoácidos, y la proteína CD3 γ humana (NCBI RefSeq N.º NP_000064), que tiene una longitud de 182 aminoácidos.

Las expresiones “anticuerpo anti-CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para actuar sobre CD3.

- En una forma de realización, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-CD3 a una proteína no-CD3 no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a CD3 según se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 250 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD3 se une a un epítipo de CD3 que se conserva entre CD3 de diferentes especies.
- El término “anticuerpo” se usa en la presente en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, bis-Fab), siempre y cuando presenten la actividad de unión a antígenos deseada.
- “Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X a su componente Y puede representarse en general con la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente. A continuación se describen aspectos ilustrativos y de ejemplo específicos para medir la afinidad de unión.
- Un anticuerpo “madurado por afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo de origen que no posee tales alteraciones, en donde tales alteraciones producen una mejora de la afinidad del anticuerpo al antígeno.
- Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se usan en la presente de manera indistinta para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en la presente.
- Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se

une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, bis-Fab; Fv; Fab; Fab'; Fab'-SH; F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv, ScFab); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

- 5 Un "anticuerpo de dominio único" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo. En algunos aspectos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.248.516 B1). Los ejemplos
10 de anticuerpos de dominio único incluyen, entre otros, VHH.

Un fragmento "Fab" es un fragmento de unión al antígeno generado mediante digestión con papaína de anticuerpos y consiste en una cadena L completa con el dominio de la región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos
15 Fab idénticos. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un único fragmento F(ab')₂ grande, que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab ligados por disulfuro que tienen actividad de unión al antígeno divalente y aun así son capaces de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen algunos residuos adicionales en el terminal carboxi del dominio CH1 que incluye una o
20 más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es como se denomina en la presente a los Fab', en donde los residuos de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre estos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

- 25 "Fv" consiste en un dímero de un dominio de la región variable de la cadena pesada y uno de la cadena liviana en asociación estrecha no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de la cadena H y tres de la cadena L) que contribuyen los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un
30 dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo a una afinidad menor que la del sitio de unión completo.

La expresión "región Fc" en la presente se usa para definir una región del terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencias nativas
35 y regiones Fc variantes. Si bien los límites de la región Fc de una cadena pesada de la

inmunoglobulina pueden variar, en general, la región Fc de la cadena pesada IgG humana se define para que abarque desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el terminal carboxilo de aquel. La lisina del terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede
5 eliminar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o al modificar mediante ingeniería genética de manera recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, la composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpo con eliminación de todos los residuos Lys447, poblaciones de anticuerpo sin eliminación de residuos Lys447 y
10 poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con o sin residuo Lys447.

Una “región Fc funcional” tiene una función efectora de una región Fc de una secuencia nativa. Los ejemplos de “funciones efectoras” incluyen unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación descendente de los receptores
15 superficiales celulares (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. En general, las funciones efectoras requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo), y se pueden evaluar mediante distintos ensayos como se divulgan, por ejemplo, en definiciones en la presente.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos
20 idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc natural. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, además de las variantes naturales de estas.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere
25 de la de una región Fc de secuencia nativa en al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido
30 de origen, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos y, preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido de origen. Preferentemente, la región Fc variante en la presente tiene al menos alrededor de 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una
35 región Fc de un polipéptido de origen, preferentemente, al menos alrededor de 90 % de

homología con estas, o preferentemente, al menos alrededor de 95 % de homología con estas.

“Complejo Fc”, como se usa en la presente, se refiere a dominios CH3 de dos regiones Fc que interactúan entre sí para formar un dímero o, como en algunos aspectos, dos regiones Fc interactúan para formar un dímero, en donde los residuos de cisteína en las regiones bisagra y/o los dominios CH3 interactúan a través de enlaces y/o fuerzas (por ejemplo, Van der Waals, fuerzas hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o enlaces disulfuro).

“Componente Fc”, como se usa en la presente, se refiere a una región bisagra, un dominio CH2 o un dominio CH3 de una región Fc.

“Región bisagra” se define, en general, como abarcativa de alrededor del residuo 216 a 230 de una IgG (numeración EU), de alrededor del residuo 226 a 243 de una IgG (numeración de Kabat), o de alrededor del residuo 1 a 15 de una IgG (numeración única IMGT).

La “región bisagra inferior” de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente en el terminal C con respecto a la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc (numeración EU).

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido de origen, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos y, preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido de origen. Preferentemente, la región Fc variante en la presente tiene al menos alrededor de 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido de origen y, preferentemente, al menos alrededor de 90 % de homología con estas, con mayor preferencia, al menos alrededor de 95 % de homología con estas.

“Receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Un FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluso las variantes alélicas y, alternativamente, las formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen

secuencias de aminoácidos similares que difieren, principalmente, en los dominios citoplasmáticos de estos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo activador a base de tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inhibidor a base de tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico (ver la reseña M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Se hace una reseña de los FcR, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel *et al.* Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluso aquellos que se identificarán en el futuro, se encuentran comprendidos en el término "FcR" de la presente. La expresión también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)).

La expresión tecnología "botón en ojal" o "KnH", como se menciona en la presente, se refiere a la tecnología dirigida al emparejamiento de dos polipéptidos juntos *in vitro* o *in vivo* mediante la introducción de una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfase en la que interactúan. Por ejemplo, se introdujeron KnH en las interfases de interacción Fc:Fc, interfases CL:CH1 o interfases VH/VL de anticuerpos (por ejemplo, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) Protein Science 6:781-788). Esto es particularmente útil para impulsar el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes durante la elaboración de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KnH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables únicos unidos a cada región Fc, o pueden comprender además diferentes dominios variables de la cadena pesada que se emparejan con dominios variables de la cadena liviana idénticos, similares o diferentes. La tecnología KnH también se puede usar para emparejar dos dominios extracelulares del receptor diferentes o cualquier otra secuencia de polipéptido que comprenda diferentes secuencias de reconocimiento diana.

"Región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable que no sean residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable consiste por lo general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, en general las secuencias de HVR y FR aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

La "región CH1" o "dominio CH1" comprende el tramo de residuos de alrededor del residuo 118 al residuo 215 de una IgG (numeración EU), de alrededor del residuo 114

al 223 de una IgG (numeración de Kabat), o de alrededor del residuo 1.4 al residuo 121 de una IgG (numeración única IMGT) (Lefranc M-P, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles A, Paysan-Lafosse T, Hadi-Saljoqi S, Sasorith S, Lefranc G, Kossida S. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(edición de la base de datos):D413-22). El polipéptido IL-15 o polipéptido IL-15R α se puede conectar, de manera covalente, directamente al primer residuo del dominio CH1, o de manera alternativa, se puede conectar, de manera covalente, a un residuo en una posición en el terminal C con respecto al primer residuo de CH1. En aspectos alternativos, el polipéptido IL-15 o polipéptido IL-15R α se puede conectar, de manera covalente, a CH1 a través de un ligador como se define en la presente.

El “dominio CH2” de una región Fc de IgG humana abarca, en general, de alrededor del residuo 244 a alrededor de 360 de una IgG (numeración de Kabat), de alrededor del residuo 231 a alrededor de 340 de una IgG (numeración EU), o de alrededor del residuo 1.6 a alrededor de 125 de una IgG (numeración única IMGT). El dominio CH2 es único en cuanto a que no se empareja estrechamente con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidratos ramificadas ligadas a N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituyente para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol.22: 161-206 (1985).

El “dominio CH3” comprende el tramo de residuos en el terminal C con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de alrededor del residuo de aminoácido 361 a alrededor del residuo de aminoácido 478 de una IgG (numeración de Kabat), de alrededor del residuo de aminoácido 341 a alrededor del residuo de aminoácido 447 de una IgG (numeración EU), o de alrededor del residuo de aminoácido 1.4 a alrededor del residuo de aminoácido 130 de una IgG (numeración única IMGT)).

El “dominio CL” o “dominio liviano constante” comprende el tramo de residuos en el terminal C con respecto a un dominio variable de la cadena liviana (VL). La cadena liviana de un anticuerpo puede ser una región de la cadena liviana kappa (κ) (“C κ ”) o lambda (λ) (“C λ ”). La región C κ se extiende, en general, de alrededor del residuo 108 al residuo 214 de una IgG (numeración de Kabat o EU) o de alrededor del residuo 1.4 al residuo 126 de una IgG (numeración única IMGT). El residuo C λ se extiende, en general, de alrededor del residuo 107a al residuo 215 (numeración de Kabat), o de alrededor del residuo 1,5 al residuo 127 de una IgG (numeración única IMGT) (Lefranc M-P, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles

A, Paysan-Lafosse T, Hadi-Saljoqi S, Sasorith S, Lefranc G, Kossida S. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(edición de la base de datos):D413-22).

La cadena liviana (LC) de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno
5 de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en función de las
secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Según la secuencia de
aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas
se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de
inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tiene cadenas pesadas designadas α ,
10 δ , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se vuelven a dividir en subclases en función
de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo,
seres humanos que expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e
IgA2.

Como se usa en la presente, la expresión “región cargada” se refiere a una ubicación
15 de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que incluye uno o más (por ejemplo, 1, 2,
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos básicos o ácidos que son capaces de formar un par
de carga con una región cargada cognada que tiene uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4,
5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos básicos o ácidos, cuando la región cargada y su región
cargada cognada tienen una carga relativa general opuesta.

20 Como se usa en la presente, la expresión “par de carga” se refiere al enlace que se
forma entre dos regiones cargadas de carga general opuesta.

La expresión anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en donde una porción de
la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especies en particular, mientras que
el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de fuentes o especies diferentes.

25 La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante
que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD,
IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por
ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena
pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α ,
30 δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que
corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o
derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u
otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo
35 humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos

de unión al antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen colecciones de expresión de fagos. Hoogenboom y Winter. *J. Mol. Biol.* 227:381,1991; Marks *et al.* *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991. Para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos, también se encuentran disponibles los métodos descritos en Cole *et al.* *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.* *J. Immunol.*, 147(1):86-95,1991. Ver también van Dijk y van de Winkel. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001. Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se modificó para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se desactivaron, por ejemplo, xenorratones inmunizados (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.ºs 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:3557-3562, 2006 con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Una "región estructural de consenso humano" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos que ocurren más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª edición, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En un aspecto, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, más arriba. En un aspecto, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, supra.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En algunos aspectos, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y por lo general dos, en donde todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. En algunos aspectos en los que todas o sustancialmente todas las FR de un anticuerpo humanizado corresponden a aquellas de un anticuerpo humano, cualquiera de las FR del anticuerpo humanizado puede contener uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, uno o más residuos en posiciones Vernier de FR) de FR no humanas. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una

“forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se sometió a humanización.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo que está involucrado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen en general estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Ver, por ejemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Asimismo, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano *et al. J. Immunol.* 150:880-887, 1993; Clarkson *et al. Nature* 352:624-628, 1991.

Como se usa en la presente, la expresión "región hipervariable" o "HVR" se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis CDR; tres en la VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres en la VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las CDR de ejemplo en la presente incluyen:

(a) CDR en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987);

(b) CDR en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*,

5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); y

(c) contactos con el antígeno en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al., J. Mol. Biol.* 262: 732-745, 1996).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat *et al., supra*.

"Fv monocatenario", también abreviado "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la

estructura deseada para la unión al antígeno. Para obtener una reseña de scFv, ver, por ejemplo, Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Malmborg *et al.*, *J. Immunol. Methods* 183:7-13, 1995.

- 5 “Dominio de direccionamiento” se refiere a una parte de un compuesto o una molécula que se une específicamente a un epítipo, antígeno, ligando o receptor diana. Los dominios de direccionamiento incluyen, entre otros, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpo o porciones de estos (por ejemplo, fragmentos bis-Fab, fragmentos Fab, F(ab')₂, scFab, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio único, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios VH y/o VL de anticuerpos), receptores, ligandos, aptámeros, dominios que actúan sobre péptidos (por ejemplo, proteínas con nudo de cisteína (CKP)) y otras moléculas que tienen un componente de unión identificado. Un dominio de direccionamiento puede actuar sobre, bloquear, agonizar o antagonizar el antígeno al que se une.
- 10
- 15

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por las posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de un preparado de anticuerpo monoclonal, variantes que generalmente están presentes en cantidades menores. A diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de un preparado del anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por método alguno en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse a partir de diversas técnicas, que incluyen, entre otras, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fago y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana. Dichos métodos y otros métodos de ejemplo para la elaboración de anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

20

25

30

- 35 La expresión “anticuerpo multiespecífico” se usa en el sentido más amplio y

cubre, específicamente, un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. En un aspecto, el anticuerpo multiespecífico se une a dos dianas diferentes (por ejemplo, anticuerpo biespecífico). Tales anticuerpos multiespecíficos incluyen, entre otros, un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena liviana (VL), en donde la unidad VH/VL tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios VL y VH en donde cada unidad VH/VL se une a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos en donde cada dominio variable único se une a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos y triacuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo que se unieron de manera covalente o de manera no covalente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad de unión específica a dos o más epítopos diferentes en las mismas dianas o en dianas diferentes. "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unión a un solo antígeno. En un aspecto, el anticuerpo biepitópico monoespecífico se une a dos epítopos diferentes en la misma diana/antígeno. En un aspecto, el anticuerpo poliepitópico monoespecífico se une a múltiples epítopos diferentes de la misma diana/antígeno. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítipo con una afinidad de 5 μ M a 0,001 pM, 3 μ M a 0,001 pM, 1 μ M a 0,001 pM, 0,5 μ M a 0,001 pM o 0,1 μ M a 0,001 pM.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una porción heteróloga (por ejemplo, una porción citotóxica) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 dáltones, compuestas por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas mediante un enlace disulfuro. Del terminal N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, y luego tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, del terminal N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o un dominio variable de la cadena liviana, y luego un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Como se usa en la presente, el término "inmunoadhesina" designa moléculas

que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con una especificidad de unión deseada, secuencia de aminoácidos que es diferente del sitio de unión y reconocimiento de antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga” en comparación con una región constante de un anticuerpo) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencia CH2 y/o CH3 de una IgG). Los dominios constantes de adhesina e inmunoglobulina se pueden separar opcionalmente mediante un espaciador de aminoácidos. Los ejemplos de secuencias de adhesina incluyen secuencias de aminoácidos contiguos que comprenden una porción de un receptor o un ligando que se une a una proteína de interés. Las secuencias de adhesina también pueden ser secuencias que se unen a una proteína de interés, pero que no son secuencias de receptor o ligando (por ejemplo, secuencias de adhesina en peptidocitos). Tales secuencias de polipéptido se pueden seleccionar o identificar mediante diversos métodos, que incluyen técnicas de expresión de fagos y métodos de separación de alto rendimiento. La secuencia de dominios constantes de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA (que incluye IgA1 e IgA2), IgE, IgD o IgM.

Un “agente quimioterapéutico” incluye compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigallocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamicina), radicicol, lactato dehidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sunitib (SUTENT®, Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), finasunato (VATALANIB®, Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR®, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y pipobusulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (en especial, bullatacina y bullatacinona); camptotecina (que incluye topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus

análogos sintéticos adozelesín, carzelesín y bizelesín); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); adrenocorticosteroides (que incluyen prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5-reductasas, que incluyen finasterida y dutasterida); vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat
5 dolastatina; aldesleucina, talco duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; spongistatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clomafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloroetamina clorhidrato, melfalán, novembichín, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo;
10 nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocín, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, en especial, calicheamicina γ 1I y calicheamicina ω 1I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 1994, 33:183-186); dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos
15 de antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorrubicina), morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y
20 desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como
25 denopterín, metotrexato, pteropterín, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiprarrenales,
30 tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; regenerador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; elliptinio acetato; epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona;
35 mitoxantrona; mopidamnil; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina;

losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxín; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2'2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial toxina T-2, verracurín A, roridín A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas por ingeniería genética de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE® (docetaxel, doxetaxel; Sanofi-Aventis); clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVelbina® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterín; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un agente quimioterapéutico también incluye (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluye NOLVADEX®; tamoxifeno citrato), raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (toremifina citrato); (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (megestrol acetato), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelín; buserelín, tripterelín, acetato de medroxiprogesterona, dietilstilbestrol, premarín, fluoximesterona, ácido todo transretinoico, fenretinida, así como troxacitabina (análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); (iv) inhibidores de proteína quinasa; (v) inhibidores de lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular, aquellos que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización que participan en la proliferación de células aberrantes, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas, tales como inhibidores de expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e

inhibidores de expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como vacunas para tratamiento génico, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN®, rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; y (ix) sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

5 Un agente quimioterapéutico también incluye anticuerpos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa), y el conjugado anticuerpo-fármaco, gentuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth). Los anticuerpos monoclonales humanizados adicionales con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la invención incluyen: apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gentuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab y la anti-interleucina-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research y Abbott Laboratories) que es un anticuerpo IgG1 λ de longitud completa con secuencia exclusivamente humana recombinante modificado por ingeniería genética para reconocer proteína interleucina-12 p40.

Un agente quimioterapéutico también incluye “inhibidores de EGFR”, que se refiere a compuestos que se unen o de otro modo interactúan directamente con EGFR y previenen o reducen su actividad de señalización, y de manera alternativa, se denominan “antagonista de EGFR”. Los ejemplos de este tipo de agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (ver patente estadounidense N.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de estos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano remodelado (H225) (ver

WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo que actúa sobre EGFR de longitud completa (Imclone); anticuerpos que se unen a mutante tipo II de EGFR (patente estadounidense N.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente estadounidense N.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tal como ABX-EGF o Panitumumab (ver WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo contra EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo contra EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico y, de este modo, generar un inmunoconjugado (ver, por ejemplo, EP659, 439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas, tales como los compuestos descritos en las patentes estadounidenses N.ºs: 5.616.582; 5.457.105; 5.475.001; 5.654.307; 5.679.683; 6.084.095; 6.265.410; 6.455.534; 6.521.620; 6.596.726; 6.713.484; 5.770.599; 6.140.332; 5.866.572; 6.399.602; 6.344.459; 6.602.863; 6.391.874; 6.344.455; 5.760.041; 6.002.008 y 5.747.498; así como las siguientes publicaciones PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037. Los antagonistas de EGFR con moléculas pequeñas particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluorofenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletíl)amino]-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)amino]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores de tirosina quinasa de EGFR/HER2 duales, tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6-[5-[[[2-metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen “inhibidores de tirosina quinasa” que incluyen los fármacos que actúan sobre EGFR mencionados en el párrafo anterior; inhibidor de tirosina quinasa de HER2 con moléculas pequeñas, tales como TAK165 disponible de Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina

5 quinasa de ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER duales, tales como EKB-569 (disponibles de Wyeth) que se unen preferentemente a EGFR pero inhiben células que sobreexpresan HER2 y EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor de tirosina quinasa de HER2 y EGFR oral; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de

10 Raf-1, tales como agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de TK que no actúan sobre HER, tales como imatinib mesilato (GLEEVEC®, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina quinasa con dianas múltiples, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de receptor tirosina quinasa de VEGF, tales como vatalanib

15 (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor de quinasa I con regulación extracelular de MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil

20 metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen porciones nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica a HER); quinoxalinas (patente estadounidense N.º 5.804.396); trifostinas (patente estadounidense N.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tales como CI-1033 (Pfizer);

25 Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); imatinib mesilato (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); o como se describe en cualquiera de las publicaciones de patente a continuación: patente estadounidense N.º 5.804.396; WO

30 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca) y WO 1996/33980 (Zeneca).

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen dexametasona, interferones,

35 colchicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab,

- alitretinoína, allopurinol, amifostina, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG viva, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbepoetina alfa, denileucina, dexrazoxano, epoetina alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelina, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxsalen, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvekin, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, quinacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato y ácido zoledrónico, y sales de estos farmacéuticamente aceptables.
- Los agentes quimioterapéuticos también incluyen hidrocortisona, hidrocortisona acetato, cortisona acetato, tixocortol pivalato, triamcinolona acetona, triamcinolona alcohol, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluocinonida, fluocinolona acetona, betametasona, betametasona fosfato de sodio, dexametasona, dexametasona fosfato de sodio, fluocortolona, hidrocortisona-17-butilato, hidrocortisona-17-valerato, aclometasona dipropionato, betametasona valerato, betametasona dipropionato, prednicarbato, clobetasona-17-butilato, clobetasol-17-propionato, fluocortolona caproato, fluocortolona pivalato y fluprednidenol acetato; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (ImSAID), tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isomérica (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos, tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxycloquin, leflunomideminoquina, sulfasalazina, bloqueantes de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), tales como etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), golimumab (Simponi), bloqueantes de Interleucina 1 (IL-1), tales como anakinra (Kineret), bloqueantes de coestimulación de linfocitos T, tales como abatacept (Orencia), bloqueantes de Interleucina 6 (IL-6), tales como tocilizumab (ACTEMERA®); bloqueantes de Interleucina 13 (IL-13), tales como lebrikizumab; bloqueantes de Interferón alfa (IFN), tales como Rontalizumab; bloqueantes de Beta 7 integrina, tales como rhuMAb Beta7; bloqueantes de vía de IgE, tales como Anti-M1 prime; LTA3 homotrimérica secretada y bloqueantes de LTA1/ β 2 homotrimérica unida a la membrana, tales como Anti-linfotoxina alfa (LTA); isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); diversos agentes de investigación, tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃, o inhibidores de farnesil transferasa (L-739749, L-744832); polifenoles, tales como quercetina, resveratrol, piceatanol, epigallocatequina galato, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de este;

inhibidores de autofagia, tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; acetilcamptotecina, scoplectina y 9-aminocamptotecina); podofilotoxina; tegafur (UFTORAL®); bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como vacuna THERATOPE®; perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como sodio oblimersen (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de farnesiltransferasa, tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM); y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para un tratamiento conjunto de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) en combinación con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. NSAID incluyen inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa. Los ejemplos específicos de NSAID incluyen aspirina, derivados de ácido propionico, tales como ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina y naproxeno, derivados de ácido acético, tales como indometacina, sulindac, etodolac, diclofenac, derivados de ácido enólico, tales como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam e isoxicam, derivados de ácido fenámico, tales como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico, e inhibidores de COX-2, tales como celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib y valdecoxib. Se pueden indicar NSAID para el alivio sintomático de afecciones tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artropatías inflamatorias, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, gota aguda, dismenorrea, dolor óseo metastásico, cefalea y migraña, dolor posoperatorio, dolor leve a moderado debido a la inflamación y lesión de tejido, pirexia, íleo y cólico renal.

La expresión "agente citotóxico", como se usa en la presente, hace referencia a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca la destrucción o muerte celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, isótopos radioactivos (por ejemplo,

At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes quimioterapéuticos o fármacos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes de intercalación); agentes
5 inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de estos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de estas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados más adelante.

10 Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, que incluye, entre otras, trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen las afecciones patológicas que predisponen a un mamífero al trastorno en cuestión. En un aspecto, el trastorno es un tipo de cáncer, por ejemplo, un cáncer colorrectal.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a
15 trastornos asociados a cierto grado de proliferación celular anormal. En un aspecto, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En un aspecto, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

“Tumor”, como se usa en la presente, se refiere al crecimiento y la proliferación, ya sea maligno o benigno, de todas las células neoplásicas y de todas las células y los tejidos
20 precancerosos y cancerosos. Las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente exclusivas como se hace referencia en la presente.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza en general por el crecimiento/proliferación
25 celular no regulado. Los aspectos del cáncer incluyen tipos de cáncer de tumor sólido y tipos de cáncer de tumor no sólido. Los tipos de cáncer de tumor sólido incluyen, entre otros, un cáncer colorrectal, un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas o un cáncer de próstata, o formas metastásicas de estos.
30 El cáncer puede ser un tipo de cáncer que expresa LY6G6D.

En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer colorrectal. Como se usa en la presente, la expresión “cáncer colorrectal”, “CRC”, “cáncer de colon” o “cáncer de
intestino” se refiere a un cáncer que se desarrolla desde el intestino grueso, por ejemplo, el colon o recto. En algunos aspectos, un CRC es un tumor del lado izquierdo, es decir,
35 un tumor que se produce en el colon distal (por ejemplo, el tercio distal del colon

transverso, el ángulo esplénico, el colon descendente, el colon sigmoide o el recto). En otros aspectos, un CRC es un tumor del lado derecho, es decir, un tumor que se produce en el colon proximal (por ejemplo, los dos tercios proximales del colon transverso, el colon ascendente y el ciego). Los tumores del lado derecho se pueden asociar a OS disminuida. En algunos aspectos, el CRC es metastásico. En algunos aspectos, el CRC tiene un estado de inestabilidad de microsatélites de “microsatélite estable” (“MSS”) o “inestabilidad de microsatélites baja” (“MSI-L”). En otros aspectos, el CRC tiene un estado de inestabilidad de microsatélites de “inestabilidad de microsatélites alta” (“MSI-H”). En algunos aspectos, el CRC es un CRC que expresa LY6G6D (LY6G6D+).

10 Como se usa en la presente, “estado de inestabilidad de microsatélites” o “estado de MSI” se refiere a una caracterización de la estabilidad de microsatélites en un tejido tumoral de un paciente. El tejido tumoral de un paciente se puede caracterizar como “inestabilidad de microsatélites alta” (“MSI-H”), “inestabilidad de microsatélites baja” (“MSI-L”) o “microsatélite estable” (“MSS”). El estado de MSI se puede evaluar, por ejemplo, usando un enfoque basado en PCR tal como el MSI Analysis System (Promega, Madison, WI), que está compuesto por 5 repeticiones de mononucleótidos pseudomonómorficos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) para detectar MSI y 2 locus de pentanucleótidos (PentaC y PendaD) para confirmar la identidad entre muestras normales y tumorales. El tamaño en las bases para cada locus de microsatélite se puede determinar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel, y un tumor se puede designar MSI-H si dos o más locus de mononucleótidos varían en longitud en comparación con el ADN de la línea germinal. Ver, por ejemplo, Le *et al.* *NEJM* 372:2509-2520, 2015.

25 En algunos aspectos, el estadio de un CRC se evalúa de acuerdo con el sistema de clasificación TNM Classification of Malignant Tumors (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC). En el sistema TNM, a los tipos de cáncer se les designa la letra T (tamaño del tumor), N (nódulos palpables) y/o M (metástasis). T1, T2, T3 y T4 describen el tamaño creciente de la lesión primaria. Asimismo, T1, T2, T3 y T4 se pueden clasificar como a o b (por ejemplo, T4a o T4b) para proporcionar mayor información sobre el estado, por ejemplo, avance local, del cáncer. N0, N1, N2, N3 indican afectación nodular de avance progresivo; y M0 y M1 reflejan la ausencia o presencia de metástasis distantes. En algunos aspectos, el CRC de un individuo es un CRC de estadio I, estadio II o estadio III, por ejemplo, un carcinoma de colon de estadio I, estadio II o estadio III. En algunos aspectos, un individuo no tiene un CRC de estadio IV. En algunos aspectos, un individuo

no tiene un CRC metastásico. En algunos aspectos, el CRC de un individuo en una población de referencia es un CRC de estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV, por ejemplo, un carcinoma de colon de estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV.

En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de mama. Otros aspectos del
5 cáncer de mama incluyen un cáncer de mama con receptores de hormonas (HR+), por ejemplo, un cáncer de mama con receptores de estrógeno (ER+), cáncer de mama con receptores de progesterona (PR+) o un cáncer de mama ER+/PR+. Otros aspectos del cáncer de mama incluyen un cáncer de mama que expresa HER2 (HER2+). Aun otros aspectos del cáncer de mama incluyen un cáncer de mama triple negativo (TNBC). En
10 algunos aspectos, el cáncer de mama es un cáncer de mama temprano. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de pulmón. Otros aspectos del cáncer de pulmón incluyen un cáncer de pulmón que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR+). Otros aspectos del cáncer de pulmón incluyen un cáncer de pulmón que no expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-). Aun
15 otros aspectos del cáncer de pulmón incluyen un cáncer pulmonar de células no pequeñas, por ejemplo, un cáncer pulmonar de células escamosas o un cáncer pulmonar de células no escamosas. Otros aspectos del cáncer de pulmón incluyen cáncer pulmonar de células pequeñas. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello. Otros aspectos del cáncer de cabeza y cuello incluyen un carcinoma
20 de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN). En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de vejiga. Otros aspectos del cáncer de vejiga incluyen un cáncer de vejiga urotelial (UBC), un cáncer de vejiga invasivo muscular (MIBC) o un cáncer de vejiga invasivo no muscular (NMIBC). En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de riñón. Otros aspectos del cáncer de riñón incluyen un carcinoma de células renales (RCC). En
25 algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de hígado. Otros aspectos del cáncer de hígado incluyen un carcinoma hepatocelular. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de próstata. Otros aspectos del cáncer de próstata incluyen un cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). En algunos aspectos, el cáncer es una forma metastásica de un tumor sólido. En algunos aspectos, la forma metastásica de un tumor
30 sólido es una forma metastásica de un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer pulmonar, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de vejiga, un cáncer de riñón, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas o un cáncer de próstata. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer de tumor no sólido. Los tipos de cáncer de tumor no sólido incluyen, entre otros, tipos de cáncer hematológicos, por ejemplo, un
35 linfoma de linfocitos B. Otros aspectos de linfoma de linfocitos B incluyen, por ejemplo,

una leucemia linfocítica crónica (CLL), un linfocitos de linfocitos B grandes difusos (DLBCL), un linfoma folicular, síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma no Hodgkin (NHL), una leucemia linfoblástica aguda (ALL), un mieloma múltiple, una leucemia mieloide aguda (AML) o una micosis fungoide (MF).

5 Las “funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y unión a C1q; unión a receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación
10 descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

“Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía del complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento
15 (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada) que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” o “ADCC” se
20 refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada unida a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células *natural killer* (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y que posteriormente inactiven la célula diana con agentes citotóxicos. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas
25 y son absolutamente necesarios para tal inactivación. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92, 1991. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede
30 realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las patentes estadounidenses N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Natural Killer (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el que se
35 divulga en Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:652-656, 1998.

Como se usa en la presente, “complejo” o “en complejo” se refiere a la asociación de dos o más moléculas que interactúan entre sí a través de enlaces y/o fuerzas (por ejemplo, fuerzas Van der Waals, hidrófobas, hidrofílicas) que no son enlaces peptídicos. En un aspecto, el complejo es heteromultimérico. Cabe destacar que las expresiones

5 "complejo de proteínas" o "complejo de polipéptidos", como se usa en la presente, incluyen complejos que tienen una entidad que no es proteína conjugada con una proteína en el complejo de proteínas (por ejemplo, que incluye, entre otros, moléculas químicas tales como una toxina o un agente de detección).

Como se usa en la presente, “retrasar la progresión” de un trastorno o una enfermedad

10 significa aplazar, obstaculizar, ralentizar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o el trastorno (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer). Este retraso puede ser de diversas duraciones, según los antecedentes de la enfermedad y/o el individuo que se trata. Como es evidente para la persona del oficio de nivel medio, un retraso suficiente o considerable puede implicar

15 efectivamente la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer de estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

Una “cantidad eficaz” de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención o una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) de este, es al

20 menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, tal como una mejora o prevención medible de un trastorno particular (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer). Una cantidad eficaz en la presente puede variar de acuerdo con factores tales como condición patológica, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para producir una respuesta

25 deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa mediante los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados deseados o beneficiosos incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso del inicio de la enfermedad, lo que incluye

30 síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se producen durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como disminuir uno o más síntomas producidos por la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la

35 enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la

enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento, tal como mediante direccionamiento, retraso de la progresión de la enfermedad y/o prolongación de la supervivencia. En el caso del cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto de reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño del tumor; 5 inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto o, de manera conveniente, detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, de manera conveniente, detener) metástasis del tumor; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más síntomas asociados al trastorno. Una cantidad eficaz se puede proporcionar en una o más 10 administraciones. A los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de un fármaco, un compuesto o una composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se sabe en el ámbito clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, un compuesto o una composición farmacéutica se pueden lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o 15 composición farmacéutica. Por ello, una “cantidad eficaz” se puede considerar en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un solo agente se puede considerar administrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado conveniente.

El término “epítipo” se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno al que se 20 une un anticuerpo. En algunos aspectos, el sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo se determina mediante huella de radicales hidroxilo. En algunos aspectos, el sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo se determina mediante cristalografía.

Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se usa en la presente, se refiere a un 25 compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que previene o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otro aspecto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Los aspectos de 30 agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes bloqueadores de la progresión cíclica celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como los agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y 35 bleomicina. Aquellos agentes que interrumpen G1 también afectan la interrupción de la

fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos, ambos derivados del árbol de tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabiliza microtúbulos mediante prevención de la despolimerización, que produce la inhibición de mitosis en células.

Las expresiones "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera indistinta y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, inclusive la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de estas, independientemente de la cantidad de pases. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de ácido nucleico con respecto a una célula parental, sino que puede contener mutaciones. En la presente se incluyen progenies mutantes que pueden tener la misma función o actividad biológica que se identifica o selecciona en la célula transformada originalmente.

Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está ligado. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se introdujo. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que se ligan operativamente. En la presente, dichos vectores se denominan "vectores de expresión". Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluso, entre otros, un agente citotóxico.

La expresión "agente inmunomodulador" se refiere a una clase de moléculas que modifica la respuesta del sistema inmunitario o el funcionamiento del sistema inmunitario. Los agentes inmunomoduladores incluyen, entre otros, antagonistas de unión al eje de PD-1, anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T y vacunas contra el cáncer personalizadas a base de ARN, así como talidomida (α -N-ftalimido-glutarimida) y sus análogos, OTEZLA® (apremilast), REVLIMID® (lenalidomida) y ACTI-

MID™ (pomalidomida), y sales o ácidos farmacéuticamente aceptables.

Un “sujeto” o un “individuo” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En algunos aspectos, el sujeto o individuo es un ser humano.

Una proteína o péptido “aislado” es aquel que se separó de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos, una proteína o péptido se purifica hasta más de 95 % o 99 % de pureza según se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico).

Un ácido nucleico “aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se separó de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que, en general, contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural. La expresión “antagonista de unión al eje de PD-1” se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un componente de unión al eje de PD-1 con uno o más de sus componentes de unión, a fin de eliminar la disfunción de linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización de PD-1, que tiene como resultado reestablecer o mejorar la función de linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, inactivación de células diana). Como se usa en la presente, un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

La expresión “antagonista de unión a PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus componentes de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión al antígeno de estos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprimen o interfieren en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por, o a

través de, proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 a fin de lograr que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab). En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (pembrolizumab). En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MED1-0680. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es PDR001. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es REGN2810. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es BGB-108.

La expresión “antagonista de unión a PD-L1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus componentes de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos aspectos, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión al antígeno de estos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprimen o interfieren en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-1, B7-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por, o a través de, proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 a fin de lograr que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. Aun en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A (atezolizumab, comercializado como TECENTRIQ™ con WHO Drug Information (Denominaciones comunes internacionales para las sustancias farmacéuticas), INN recomendadas: Lista 74, vol. 29, N.º 3, 2015 (ver página 387)). En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0015718C. Aun en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736.

La expresión “antagonista de unión a PD-L2” se refiere a una molécula que disminuye,

bloquea, inhibe, suprime o interfiere en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus componentes de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos aspectos, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión al antígeno de estos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprimen o interfieren en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por, o a través de, proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 a fin de lograr que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

El término "proteína", como se usa en la presente, se refiere a cualquier proteína nativa de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. Las expresiones abarcan la proteína sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, sin tener en cuenta sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, mediante el uso de *software* informático disponible al público, tal como *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualesquier algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin

embargo, a los fines de la presente, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se presentó junto con la documentación del usuario en la Oficina del Derecho de Autor de los Estados Unidos de América, Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el número de registro del derecho de autor de los Estados Unidos de América TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para usar en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son predeterminados por el programa ALIGN-2 y no varían. En casos donde ALIGN-2 se usa para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B determinada (que, alternativamente, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo anterior mediante el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a un preparado que se encuentra en una forma tal para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo contenido en su interior sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un

sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

“Tratamiento de radiación” se refiere al uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir daño suficiente a una célula y limitar su capacidad de funcionar de manera normal o destruir completamente la célula. Cabe destacar que habrá muchas formas conocidas en el estado de la técnica para determinar la dosis y duración del tratamiento. Los tratamientos comunes se proporcionan como una administración única y las dosis comunes varían de 10 a 200 unidades (Grays) por día.

Como se usa en la presente, “tratamiento” (y sus variaciones gramaticales tales como “tratar” o “que se trata”) se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se está tratando y se puede llevar a cabo para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado patológico y la remisión o pronóstico mejorado. En algunos aspectos, los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D de la invención) se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

Con “reducir o inhibir” se hace referencia a la capacidad de generar una disminución general, por ejemplo, de 20 % o más, de 50 % o más, o de 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunos aspectos, reducir o inhibir puede hacer referencia a la función efectora de un anticuerpo que está mediada por la región Fc del anticuerpo, tales funciones efectores incluyen específicamente citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

De acuerdo con la invención, el término “vacuna” se refiere a un preparado farmacéutico (composición farmacéutica) o producto que, después de la administración, induce una respuesta inmunitaria, en particular, una respuesta inmunitaria celular, que reconoce y ataca a un patógeno o una célula enferma, tal como una célula cancerosa. Se puede usar una vacuna para la prevención o el tratamiento de una enfermedad. Una vacuna puede ser una vacuna contra el cáncer. Una “vacuna contra el cáncer”, como se usa en la presente, es una composición que estimula una respuesta inmunitaria en un sujeto contra un cáncer. En general, las vacunas contra el cáncer consisten en una fuente de material asociado al cáncer o células (antígeno) que pueden ser autólogas (propias) o

alógenas (de otros) al sujeto, junto con otros componentes (por ejemplo, adyuvantes) para estimular y reforzar adicionalmente la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Las vacunas contra el cáncer pueden dar como resultado la estimulación del sistema inmunitario del sujeto para producir anticuerpos contra uno o varios antígenos
5 específicos y/o para producir linfocitos T *killer* para atacar células cancerosas que tienen esos antígenos.

La expresión “vacuna contra el cáncer personalizada” (“PCV”) se refiere a una vacuna contra el cáncer que se adapta a las necesidades o circunstancias especiales de un paciente individual con cáncer. En algunos aspectos, la PCV estimula una respuesta
10 inmunitaria contra una o más mutaciones somáticas específicas del cáncer presentes en células cancerosas del paciente, como se describe, por ejemplo, en las publicaciones PCT N.^{os} WO2014/082729 y WO2012/159754. La mutación somática específica del cáncer puede estar presente en cualquier célula cancerosa de un paciente, por ejemplo, una célula tumoral, por ejemplo, una célula tumoral circulante. En algunos aspectos, la
15 mutación somática específica del cáncer se descubre usando secuenciación de nueva generación. En algunos aspectos, un polipéptido que comprende la mutación somática específica del cáncer o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN, por ejemplo, un ARN transcrito *in vitro*) que codifica un polipéptido que comprende la mutación somática específica del cáncer se administra al paciente para estimular la respuesta inmunitaria
20 del paciente.

Como se usa en la presente, “administración” se refiere a un método para administrar una dosis de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención) a un sujeto. En algunos aspectos, las composiciones utilizadas en los métodos en la presente se administran por vía intravenosa. Las composiciones utilizadas en los
25 métodos descritos en la presente se pueden administrar, por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical,
30 intraocular, oral, tópica, local, mediante inhalación, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña células diana directamente, catéter, lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El método de administración puede variar según diversos factores (por ejemplo, el compuesto o la composición que se administra y la gravedad de la afección, la enfermedad o el trastorno que se trata).

35 II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos anti-complejo 6

del antígeno linfocítico, locus G61 (anti-LY6G6D). En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-LY6G6D son multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) y se unen, además de unirse a LY6G6D o un fragmento de este, a una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno superficial de un linfocito T, por ejemplo, el grupo de diferenciación 3 (CD3). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, un cáncer colorrectal (CRC) (por ejemplo, un CRC que expresa LY6G6D) o un trastorno autoinmunitario, o para mejorar la función inmunitaria en un sujeto que tiene dicho trastorno.

10 A. *Anticuerpos anti-LY6G6D de ejemplo*

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a LY6G6D. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D se une a un polipéptido LY6G6D humano (SEQ ID NO: 75) o un polipéptido LY6G6D de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 77). En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D se une a un epítipo que comprende, o dentro de, los aminoácidos 93-104 (SEQ ID NO: 87), 94-103 (SEQ ID NO: 78) o 99-101 (SEQ ID NO: 79) de LY6G6D (por ejemplo, LY6G6D humano). En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D se une a uno, dos, tres o los cuatro residuos Arg94, Leu101, Cys102 y Asn103 de LY6G6D. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D se une a un epítipo que comprende los residuos Arg94, Asp95, Cys96, Tyr97, Leu98, Gly99, Asp100, Leu101, Cys102 y Asn103 de LY6G6D. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D se une a un epítipo que consiste en los residuos Arg94, Asp95, Cys96, Tyr97, Leu98, Gly99, Asp100, Leu101, Cys102 y Asn103 de LY6G6D.

Un epítipo de LY6G6D puede determinarse mediante la unión del dominio de unión a LY6G6D del anticuerpo anti-LY6G6D a fragmentos de péptido del epítipo. Un epítipo de LY6G6D también puede determinarse mediante mutagénesis por barrido de alanina. En una forma de realización, una reducción en la unión de un dominio de unión a LY6G6D al LY6G6D mutado de 20 %, 30 %, 50 %, 80 % o más indica que el residuo de aminoácido de LY6G6D mutado en un ensayo de mutagénesis por barrido de alanina es un residuo epitópico para el dominio de unión a LY6G6D. De manera alternativa, un epítipo de LY6G6D puede determinarse mediante espectrometría de masas. En algunas formas de realización, el epítipo se determina mediante cristalografía (por ejemplo, métodos de cristalografía).

En algunas formas de realización, un epítipo de LY6G6D puede determinarse mediante métodos de cristalografía combinando un Fab de anticuerpo anti-LY6G6D, disuelto en una condición particular (por ejemplo, NaCl 0,15 M, tris 25 mM, pH 7,5 a 10 mg/ml), con

un exceso molar (por ejemplo, un exceso molar doble) de un péptido de LY6G6D y cribando inicialmente una matriz de precipitantes en un formato de difusión de vapor de gota colgante o sentada. Los cristales optimizados se pueden cultivar, por ejemplo, de una mezcla 1:1 con solución de reservorio que contiene 70 % v/v de metil-pentandiol y amortiguador de HEPES 0,1 M a pH 7,5. El reservorio se puede usar como crioprotector. Los cristales se pueden transferir a temperatura criogénica mediante inmersión repentina en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción para cristales se pueden recolectar en una línea de haz. Las difracciones registradas se pueden registrar y ajustar en escala usando un programa, tal como HKL2000.

La estructura se puede resolver mediante reemplazo molecular (MR), por ejemplo, usando un programa tal como Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda por MR es una subunidad Fab derivada de una estructura de cristal del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido de LY6G6D se incrusta en la estructura en función de un mapa Fo-Fc. La estructura se puede refinar posteriormente con los programas REFMAC5 y PHENIX usando el método de refinamiento del factor B individual anisotrópico y el método de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o cualquiera de SEQ ID NO: 99-107.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 111; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 112 o SEQ ID NO: 113; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o cualquiera de SEQ ID NO: 99-107.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un
10 dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un
dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un
15 dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un
dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.

30 En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un
dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la
35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

35 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede tener un dominio VH que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que comprende la secuencia de, SEQ ID NO: 10 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que comprende la secuencia de, SEQ ID NO: 11. En un caso particular, el anticuerpo anti-LY6G6D puede ser 20A12.QNTv12 (que incluye variantes de elaboración de una célula y de dos células), o un derivado o análogo clonal de este. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D

10 tiene un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D tiene un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

15 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

20 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

25 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y/o comprende las cuatro

30 de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede tener un dominio VH que comprende la secuencia de

35 aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y/o un dominio VL que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y/o comprende las cuatro de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede tener un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y/o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-LY6G6D puede ser humanizado. En una forma de realización, el anticuerpo anti-LY6G6D comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además una estructura humano aceptor, por ejemplo, una estructura de inmunoglobulina humano o una estructura de consenso humano.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo anti-LY6G6D de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D es un anticuerpo quimérico o humano. En un aspecto, el anticuerpo anti-LY6G6D es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG intacto (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase de anticuerpo o isotipo definido en la presente.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-LY6G6D de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o combinadas, como se describe en las Secciones 1-8 a continuación.

B. Anticuerpos anti-CD3 de ejemplo

5 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen al grupo de diferenciación 3 (CD3) (por ejemplo, CD3 ϵ y/o CD3 γ) y tienen las siguientes seis secuencias de CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; 10 (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 51, una secuencia de VL que comprende SEQ ID NO: 21, 55, 90 o 92, secuencias de VL y VH que comprenden SEQ ID NO: 21 o 55 y 20, 15 respectivamente, o secuencias de VL y VH que comprenden SEQ ID NO: 90 o 92 y 89, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 se une a un polipéptido CD3 humano o un polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis*. En algunos casos, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3 ϵ humano (SEQ ID NO: 80) o un polipéptido CD3 ϵ de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 20 81), respectivamente. En algunos casos, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3 γ humano (SEQ ID NO: 82) o un polipéptido CD3 γ de *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 83), respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 se une a un epítipo dentro de un fragmento de CD3 (por ejemplo, CD3 ϵ humano) que consiste en los aminoácidos 1-26 (SEQ ID NO: 84) o 1-27 25 (SEQ ID NO: 85) de CD3 ϵ humano.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 que tiene un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (c) una CDR-H3 que comprende la 30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 que tiene un 35 dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 20 o 89 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de
10 SEQ ID NO: 21 o 90. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 38E4.v1 MD1, o un derivado o un análogo clonal de este.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 20 o 89 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de
15 SEQ ID NO: 55 o 92. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 38E4.v1 MD4 o un derivado o un análogo clonal de este.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO: 43 o SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 63; (c) una
25 FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; (c) una FR-H3 que
30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o comprende las cuatro de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4
35 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

- En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que
- 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o comprende las cuatro de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
- 10 En cualquiera de las formas de realización anteriores, un anticuerpo anti-CD3 puede ser humanizado. En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD3 comprende CDR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y comprende además una estructura aceptor humano, por ejemplo, una estructura de inmunoglobulina humano o una estructura de consenso humano.
- 15 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3, en donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, en donde una o ambas de las secuencias de dominio variable incluyen modificaciones posteriores a la traducción.
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 20 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 21, o un anticuerpo anti-CD3 que comprende una
- 25 secuencia de VH de SEQ ID NO: 20 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 55. En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de un fragmento de CD3 (por ejemplo, CD3ε humano) que consiste en los aminoácidos 1-26 (SEQ ID NO: 84) o 1-27 (SEQ ID NO: 85) de CD3ε humano.
- En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de
- 30 las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo quimérico o humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG intacto
- 35 (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase de anticuerpo o isotipo definido en

la presente.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o combinadas, como se describe en las Secciones 1-8 a continuación.

5 1. Afinidad de anticuerpos

En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 250 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 6 \text{ nM}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

10 En una forma de realización, la K_D se mide a través de un ensayo de unión a antígeno radioetiquetado (RIA). En una forma de realización, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de Fab para un antígeno se mide al equilibrar Fab con una concentración mínima de un antígeno etiquetado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de
15 antígeno no etiquetado, capturando luego el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpos anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas de múltiples cavidades MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio ($\text{pH } 9,6$), y luego se
20 bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente, 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620) se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, que coinciden con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Luego, el Fab de interés
25 se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más prolongado (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego la solución se retira, y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al $0,1$
30 $\%$ en PBS. Una vez que se secan las placas, se agregan $150 \mu\text{l/cavidad}$ de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard) y se realiza el recuento de las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan una cantidad menor o igual a 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitivos.

35 De acuerdo con otra forma de realización, la K_D se mide con un ensayo de resonancia

de plasmones superficiales BIACORE®. Por ejemplo, un ensayo que utiliza BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 37 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En una forma de realización, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de 2 veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 37 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on} o k_a) y de disociación (k_{off} o k_d) se calculan mediante el uso de un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación (K_D) de equilibrio se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales mencionado anteriormente, la tasa de asociación puede determinarse mediante el uso de una técnica de desactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 37 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según la medición en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D proporcionado en la presente se une a un polipéptido LY6G6D humano con una K_D de alrededor de 1 nM a 500 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore, por ejemplo, se une a LY6G6D humano con una K_D de $\leq 1 \text{ µM}$, $\leq 250 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 40 \text{ nM}$, $\leq 30 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 6 \text{ nM}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D proporcionado en la presente se une al polipéptido LY6G6D humano con una K_D de alrededor de 100 nM a 0,01 nM; de alrededor de 50 nM a 5 nM; de alrededor de 40 nM a 10 nM; de alrededor de 35 nM a 15 nM; o de alrededor de 30 nM a 20 nM.

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente se une a un polipéptido CD3 humano con una K_D de alrededor de 100 pM a 10 pM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore, por ejemplo, se une a CD3 humano con una K_D de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 250 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 40 \text{ nM}$, $\leq 30 \text{ nM}$, $\leq 15 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD3 proporcionado en la presente se une al polipéptido CD3 humano con una K_D de alrededor de 100 nM a 0,01 nM; de alrededor de 50 nM a 5 nM; de alrededor de 40 nM a 10 nM; de alrededor de 35 nM a 15 nM; o de alrededor de 30 nM a 20 nM.

10 2. Fragmentos de anticuerpos

En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D o un anticuerpo anti-CD3) es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos más adelante. Para obtener una reseña de determinados fragmentos de anticuerpos, ver Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para obtener una reseña sobre fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315, (1994); ver también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses N.ºs 5,571,894 y 5,587,458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida aumentada *in vivo*, ver la patente estadounidense N.º 5,869,046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos se describen también en Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6,248,516 B1).

Se pueden producir fragmentos de anticuerpos mediante diversas técnicas, las cuales incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la

producción por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D o un anticuerpo anti-CD3) es un anticuerpo quimérico. Algunos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 4,816,567; y Morrison *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con "cambio de clase" en el que la clase o subclase se ha cambiado con respecto a la del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos.

En algunas formas de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Por lo general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad con respecto a seres humanos, al tiempo que conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR (o porciones de estas), por ejemplo, derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de estas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas formas de realización, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Se analizan anticuerpos humanizados y métodos para elaborarlos, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se los describe adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes estadounidenses N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de una región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "resurgimiento"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la "transposición de FR"); Y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) Y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" de la transposición de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden utilizar para la humanización incluyen entre otras: regiones estructurales seleccionadas usando el método de “ajuste óptimo” (ver, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena liviana o pesada (ver, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales humanas maduras (mutadas de manera somática) o regiones estructurales de línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (ver, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D o un anticuerpo anti-CD3) es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, por lo general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos al administrar un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Por lo general, tales animales contienen la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de manera extracromosómica o integrados de manera aleatoria en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, y en líneas generales, los locus de inmunoglobulina endógena se han inactivado. Para una reseña de los métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Ver también, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense N.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense N.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante

humana diferente.

También se pueden producir anticuerpos humanos mediante métodos a base de hibridomas. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por
5 ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Métodos
10 adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and*
15 *Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos al aislar secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de colecciones de expresión en fago derivadas de seres humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse luego con un
20 dominio constante humano deseado. Más adelante se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

Es posible aislar los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D o anticuerpos anti-CD3) mediante el cribado de colecciones de combinaciones en busca
25 de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para generar colecciones de expresión en fago y cribar tales colecciones en búsqueda de anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y también se describen, por ejemplo en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554;
30 Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
35 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-

132(2004).

En determinados métodos de expresión de fagos, se clonan por separado repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se recombinan de manera aleatoria en colecciones de fagos, que luego pueden cribarse en busca de fagos de unión a antígenos como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). El fago presenta por lo general fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De manera alternativa, el repertorio indiferenciado puede clonarse (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia variedad de no autoantígenos y también autoantígenos sin inmunización, como se describe en Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, es posible producir colecciones indiferenciadas en forma sintética mediante la clonación de segmentos de gen V sin reordenamiento de células madre y la utilización de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y lograr el reordenamiento *in vitro*, como describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones en fago de anticuerpos humano incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense N.º 5.750.373, y las publicaciones de patentes estadounidenses N.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente.

6. *Anticuerpos multiespecíficos*

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-LY6G6D o anti-CD3 proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En algunos aspectos, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de LY6G6D. En algunos aspectos, una de las especificidades de unión es para LY6G6D y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie de un linfocito T, por ejemplo CD3). En algunos aspectos, una de las especificidades de unión es para CD3

y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, un antígeno tumoral). En algunos aspectos, una de las especificidades de unión es para LY6G6D y la otra es para CD3.

- 5 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D comprende (a) un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) que comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) y (b) un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) que
10 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2) que comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL2). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD3 que tiene un primer dominio de unión que comprende (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:
15 16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 51, tal como 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4, puede tener un segundo
20 dominio de unión que se une a un antígeno de superficie celular (por ejemplo, un antígeno tumoral, por ejemplo, LY6G6D) en una célula diana diferente de una célula efectora inmunitaria.

En algunos aspectos, el antígeno de superficie celular se puede expresar en un número bajo de copias en la célula diana. Por ejemplo, en algunos aspectos, el antígeno de
25 superficie celular se expresa o está presente en al menos 35.000 copias por célula diana. En algunas formas de realización, el antígeno celular de bajo número de copias está presente en un número de 100 a 35.000 copias por célula diana; de 100 a 30.000 copias por célula diana; de 100 a 25.000 copias por célula diana; de 100 a 20.000 copias por célula diana; de 100 a 15.000 copias por célula diana; de 100 a 10.000 copias por
30 célula diana; de 100 a 5000 copias por célula diana; de 100 a 2000 copias por célula diana; de 100 a 1000 copias por célula diana; o de 100 a 500 copias por célula diana. El número de copias del antígeno de superficie celular se puede determinar, por ejemplo, usando un gráfico de Scatchard estándar.

Por ejemplo, en algunos aspectos, un anticuerpo anti-LY6G6D que tiene un dominio de
35 unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 puede tener un segundo dominio de unión que se une a CD3. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une a LY6G6D comprende al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena pesada FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 34-37, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 38-41, respectivamente. En otros aspectos, el primer dominio de unión que se une a LY6G6D comprende al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena pesada FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 34, 35, 36 y 37, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena liviana FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 38, 39, 40 y 41, respectivamente. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une a LY6G6D puede comprender, por ejemplo, (a) un dominio VH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 10, y (b) un dominio VL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 11, tal como la que posee el anticuerpo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 descrito en la presente. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une a LY6G6D comprende (a) un dominio VH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 59 y (b) un dominio VL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 60. En algunos aspectos del anticuerpo anti-LY6G6D antes descrito que tiene un dominio de unión que se une a CD3, el segundo dominio que se une a CD3 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR seleccionadas de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (c) una CDR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 51.

En otro aspecto, el segundo dominio que se une a CD3 comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, el segundo dominio que se une a CD3 comprende un dominio de unión que comprende las seis de (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

En algunos casos, el segundo dominio que se une a CD3 comprende un dominio VH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 20 y/o un dominio VL2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 21. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 38E4.v1 MD1, o un derivado o un análogo clonal de este.

En algunos casos, el segundo dominio que se une a CD3 puede tener un dominio VH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 20 y/o un dominio VL2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96

%, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o que tiene la secuencia de, SEQ ID NO: 55. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 38E4.v1 MD4 o un derivado o un análogo clonal de este.

En algunos aspectos, el segundo dominio que se une a CD3 puede comprender al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 63; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o comprende las cuatro de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede tener un dominio VH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o un dominio VL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. En otros aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D puede tener un dominio VH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o un dominio VL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 comprende las cuatro de (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y/o comprende las cuatro de (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y (d) una FR-L4

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

En algunas formas de realización, un anticuerpo biespecífico se puede usar para localizar un agente citotóxico a una célula que expresa un antígeno tumoral, por ejemplo, Ly6G6D. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para elaborar anticuerpos multiespecíficos incluyen, entre otras, coexpresión recombinante de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada-cadena liviana que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y modificación por

ingeniería genética “botón en ojal” (ver, por ejemplo, patente estadounidense N.º 5.731.168). La modificación por ingeniería genética “botón en ojal” de anticuerpos multiespecíficos se puede utilizar para generar un primer brazo que contiene un botón y un segundo brazo que contiene el ojal al que se puede unir el botón del primer brazo. El botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-CD3

en una forma de realización. De manera alternativa, el botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-diana/antígeno en una forma de realización. El ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-CD3 en una forma de realización. De manera alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-diana/antígeno en

una forma de realización. Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden modificar por ingeniería genética con el uso de tecnología de entrecruzamiento de inmunoglobulina (también conocido como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (ver, por ejemplo, WO2009/080253; Schaefer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden

elaborar mediante modificación por ingeniería genética de efectos de conducción electrostática para elaborar moléculas Fc heterodiméricas de anticuerpo (WO 2009/089004A1); reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985));

usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando tecnología de “diacuerpo” para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico (ver, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros Fv monocatenarios (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describen, por ejemplo, en Tutt et al. *J.*

Immunol. 147: 60 (1991).

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus", también se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de estos también pueden incluir un "Fab de
5 doble efecto" o "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a CD3 así como otro antígeno diferente (por ejemplo, una segunda molécula biológica) (ver, por ejemplo, US 2008/0069820).

7. Variantes de anticuerpos

En algunos aspectos, se contemplan las variantes de secuencia de aminoácidos de los
10 anticuerpos anti-LY6G6D y/o anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se unen a LY6G6D, por ejemplo, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3, tales como los anticuerpos TDB de la invención o variantes de estos). Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del
15 anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de modificaciones apropiadas a la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se
20 puede hacer cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

a. Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En algunas formas de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen
25 una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las CDR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 con el título "Sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 con el título "Sustituciones de ejemplo" y como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se
30 pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos se pueden cribar para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión al antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejoradas.

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos preferidas y de ejemplo

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
5	Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
10	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
	Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
15	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
20	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

25 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

35 Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más residuos de regiones

hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para estudios adicionales tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, mayor afinidad, menor inmunogenicidad) en comparación con el anticuerpo parental y/o habrán retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo parental. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que se puede generar de manera conveniente, por ejemplo, mediante técnicas de maduración por afinidad a base de expresión de fagos, tales como las descritas en la presente. Brevemente, uno o más residuos de CDR se someten a mutación y las variantes de anticuerpos se expresan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). Se pueden llevar a cabo alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones se pueden llevar a cabo en los “puntos calientes” de las CDR, es decir, los residuos codificados por codones que se someten a mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o residuos que entran en contacto con un antígeno, en donde la variante de VH o VL resultante se evalúa para determinar la afinidad de unión. Se describió la maduración por afinidad mediante la construcción y reelección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O’Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas formas de realización de maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, transposición de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Luego se crea una colección secundaria. La colección luego se criba para identificar cualquier variante de anticuerpo con afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a CDR, en los que se aleatorizan varios residuos de CDR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Los residuos de CDR que participan en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, por ejemplo, mediante modelado o mutagénesis de barrido de alanina. CDR-H3 y CDR-L3 en particular son dianas frecuentes.

En algunas formas de realización, pueden presentarse sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, pueden generarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones

conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, producirse fuera de los residuos que entran en contacto con antígenos en las CDR. En algunas formas de realización de las secuencias de VH y VL variantes que se proporcionaron
5 anteriormente, cada CDR se encuentra inalterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser diana de la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", como lo describen Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un
10 residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos con carga, tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido con carga neutral o negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos, lo que demuestra sensibilidad funcional
15 a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, se puede determinar una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos pueden eliminarse como o ser candidatos diana para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

20 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones del terminal incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo del terminal N. Otras variantes de inserción de la molécula de
25 anticuerpo incluyen la fusión al terminal N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

b. Variantes de glucosilación

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-LY6G6D y/o anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se
30 unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3) se pueden alterar para aumentar o disminuir el grado de glucosilación del anticuerpo. La incorporación o eliminación de sitios de glucosilación en un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención puede lograrse de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos a fin de crear o eliminar uno
35 o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comúnmente comprenden un oligosacárido ramificado biantenarico que se une generalmente mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas formas de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En una forma de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo anti-LY6G6D y/o anti-CD3 que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) medida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en WO 2008/077546. Asn297 hace referencia al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, el Asn297 también puede ubicarse en alrededor de ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden haber mejorado la función de ADCC. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosilados" o "deficientes de fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas de células capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente estadounidense N.º US

2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., en especial en el Ejemplo 11), y líneas de células de inactivación, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO de inactivación (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

Además se proporcionan variantes de anticuerpos anti-LY6G6D y anti-CD3 con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que se biseca con GlcNAc un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patente estadounidense N.º 6.602.684 (Umana et al.); y US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener función CDC mejorada. Esas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et al.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. *Variantes de la región Fc*

En algunas formas de realización, una o más modificaciones de aminoácidos se pueden introducir en la región Fc de un anticuerpo anti-LY6G6D y/o anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D biespecífico de la invención que se une a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3, generando una variante de la región Fc (ver, por ejemplo, US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En algunas formas de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo anti-LY6G6D y/o anti-CD3 que tiene algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato conveniente para aplicaciones en donde la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras (tales como del complemento y ADCC) no son necesarias o son perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* e/o *in vivo* para confirmar la reducción/pérdida de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (y, por lo tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de

unión a FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, solo expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitativos de ensayos

5 in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente estadounidense N.º 5.500.362 (ver, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (ver Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De manera alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no

10 radiactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® no radiactivo (Promega, Madison, WI))). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células

15 *natural killer* (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad de CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la

20 activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.* *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.* *Blood.* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743 (2004)). También se puede llevar a cabo la unión a FcRn y las determinaciones *in vivo* de eliminación/semivida utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica (ver,

25 por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.* *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)). Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense N.ºs 6.737.056 y 8.219.149). Esos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297

30 y 327, que incluyen el mutante Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense N.ºs 7.332.581 y 8.219.149). En algunas formas de realización, la prolina en la posición 329 de una región Fc humana de tipo silvestre en el anticuerpo se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente extenso para destruir el sándwich de prolina dentro de

35 la interfase del receptor Fc/Fc.gamma que se forma entre la prolina 329 de los residuos

de Fc y triptófano Trp 87 y Trp 110 de FcγRIII (Sondermann et al. *Nature*. 406, 267-273, 2000). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido adicional. En una forma de realización, la sustitución de aminoácido adicional es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, y aun en otra forma de realización la al menos una sustitución de aminoácido adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana (ver, por ejemplo, US 2012/0251531), y aun en otra forma de realización la al menos una sustitución de aminoácido adicional es L234A y L235A y P329G de la región Fc de IgG1 humana.

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. (Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).) En algunas formas de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas formas de realización, se realizan alteraciones en la región Fc que generan una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificada (es decir, mejorada o disminuida), por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas mejoradas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG materna al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente estadounidense N.º 7,371,826).

Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente estadounidense N.º 5,648,260; la patente estadounidense N.º 5,624,821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D y/o anti-CD3 (por ejemplo, el anticuerpo anti- LY6G6D biespecífico) comprende una región Fc que comprende una

mutación N297G. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-LY6G6D que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-LY6G6D que comprende un primer dominio de unión que comprende las siguientes seis CDR: (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4; (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3; y un brazo anti-CD3.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-LY6G6D que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-CD3 que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y un brazo anti-CD3. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-LY6G6D que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-CD3 que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y un brazo anti-CD3.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-LY6G6D que comprende la mutación N297G comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada, en donde el uno o más dominios constantes de la cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH₁₁), un primer dominio CH2 (CH₂₁), un primer dominio CH3 (CH₃₁), un segundo dominio CH1 (CH₁₂), un segundo dominio CH2 (CH₂₂) y un segundo dominio CH3 (CH₃₂). En algunos aspectos, al menos uno del uno o más dominios constantes de la cadena pesada se empareja con otro dominio constante de la cadena pesada. En algunos aspectos, cada uno de los dominios CH₃₁ y CH₃₂ comprende una protuberancia o cavidad, y en donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH₃₁ se posiciona en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₃₂. En algunos aspectos, los dominios CH₃₁ y CH₃₂ se encuentran en una interfase entre dicha protuberancia y cavidad. En algunos aspectos, cada uno de los dominios CH₂₁ y CH₂₂ comprende una protuberancia o cavidad, y en donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH₂₁ se posiciona en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₂₂. En otros casos, los dominios CH₂₁ y CH₂₂ se encuentran en una interfase entre dicha protuberancia y cavidad. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-LY6G6D es un anticuerpo IgG1.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-LY6G6D que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 59 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 60, y un brazo anti-CD3, en donde (a) el brazo anti-LY6G6D comprende mutaciones por sustitución T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución T366W y N297G. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-LY6G6D que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 59 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 60, y un brazo anti-CD3, en donde (a) el brazo anti-LY6G6D comprende mutaciones por sustitución T366W y N297G y (b) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones por sustitución T366S, L368A, Y407V y N297G.

15 *d. Variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína*

En algunas formas de realización, puede ser conveniente crear anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína, por ejemplo, “tioMAb”, en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otras porciones, por ejemplo porciones de fármacos o porciones de fármaco-ligador, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente. En algunas formas de realización, uno o más de los siguientes residuos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos diseñados por ingeniería genética con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.521.541.

20 *e. Derivados de anticuerpos*

En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D biespecífico de la invención que se une a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3) que se proporciona en la presente se puede modificar adicionalmente para contener porciones no proteicas adicionales conocidas en el estado de la técnica y que se encuentran fácilmente disponibles. Las porciones

adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, entre otras, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles en agua incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-
5 dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener
10 ventajas en cuanto a su elaboración debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, de haber más de un polímero unido, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. Por lo general, la cantidad y/o el tipo de polímeros usados para la derivación pueden determinarse en función de
15 consideraciones que incluyen, entre otras, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usa en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otra forma de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y porción no proteica que pueden calentarse de manera selectiva mediante exposición a radiación.
20 En una forma de realización, la porción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, entre otras, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan la porción no proteica hasta una temperatura en la cual se inactivan las células próximas a la porción no proteica del anticuerpo.

25 8. Regiones cargadas

En algunos aspectos, el dominio de unión que se une a LY6G6D o CD3 comprende un VH1 que comprende una región cargada (CR_1) y un VL1 que comprende una región cargada (CR_2), en donde la CR_1 en el VH1 forma un par de carga con la CR_2 en el VL1. En algunos aspectos, la CR_1 comprende un residuo de aminoácido básico y la CR_2
30 comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR_1 comprende una mutación por sustitución Q39K (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR_1 consiste en la mutación por sustitución Q39K. En algunos aspectos, la CR_2 comprende una mutación por sustitución Q38E (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR_2 consiste en la mutación por sustitución Q38E. En algunos aspectos, el segundo dominio
35 de unión que se une a CD3 comprende un VH2 que comprende una región cargada

(CR₃) y un VL2 que comprende una región cargada (CR₄), en donde la CR₄ en el VL2 forma un par de carga con la CR₃ en el VH2. En algunos aspectos, la CR₄ comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₃ comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR₄ comprende una mutación por sustitución Q38K (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₄ consiste en la mutación por sustitución Q38K. En algunos aspectos, la CR₃ comprende una mutación por sustitución Q39E (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₃ consiste en la mutación por sustitución Q39E. En algunos aspectos, el dominio VL1 está ligado a un dominio constante de la cadena liviana (CL1) y el VH1 está ligado a un primer dominio constante de la cadena pesada (CH1), en donde el CL1 comprende una región cargada (CR₅) y el CH1 comprende una región cargada (CR₆), y en donde la CR₅ en el CL1 forma un par de carga con la CR₆ en la CH1₁. En algunos aspectos, la CR₅ comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₆ comprende un residuo ácido. En algunos aspectos, la CR₅ comprende una mutación por sustitución V133K (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₅ consiste en la mutación por sustitución V133K. En algunos aspectos, la CR₆ comprende una mutación por sustitución S183E (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₆ consiste en la mutación por sustitución S183E.

En otros aspectos, el dominio VL2 está ligado a un dominio CL (CL2) y el VH2 está ligado a un dominio CH1 (CH1₂), en donde el CL2 comprende una región cargada (CR₇) y el CH1₂ comprende una región cargada (CR₈), y en donde la CR₈ en el CH1₂ forma un par de carga con la CR₇ en el CL2. En algunos aspectos, la CR₈ comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₇ comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR₈ comprende una mutación por sustitución S183K (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₈ consiste en la mutación por sustitución S183K. En algunos aspectos, la CR₇ comprende una mutación por sustitución V133E (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₇ consiste en la mutación por sustitución V133E.

En otros aspectos, el dominio VL2 está ligado a un dominio CL (CL2) y el VH2 está ligado a un dominio CH1 (CH1₂), en donde (a) el CL2 comprende una o más mutaciones en los residuos de aminoácidos F116, L135, S174, S176 y/o T178 (numeración EU) y (b) el CH1₂ comprende una o más mutaciones en los residuos de aminoácidos A141, F170, S181, S183 y/o V185 (numeración EU). En algunos aspectos, el CL2 comprende una o más de las siguientes mutaciones por sustitución: F116A, L135V, S174A, S176F y/o T178V. En algunos aspectos, el CL2 comprende las siguientes mutaciones por sustitución: F116A, L135V, S174A, S176F y T178V. En algunos aspectos, el CH1₂ comprende una o más de las siguientes mutaciones por sustitución: A141I, F170S,

S181M, S183A y/o V185A. En algunos aspectos, el CH1₂ comprende las siguientes mutaciones por sustitución: A141I, F170S, S181M, S183A y V185A.

En otros aspectos, el dominio de unión que se une a LY6G6D o CD3 comprende un dominio VH (VH1) que comprende una región cargada (CR₁) y un dominio VL (VL1) que
5 comprende una región cargada (CR₂), en donde la CR₂ en el VL₁ forma un par de carga con la CR₁ en el VH1. En algunos aspectos, la CR₂ comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₁ comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR₂ comprende una mutación por sustitución Q38K (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₂ consiste en la mutación por sustitución Q38K. En algunos aspectos, la
10 CR₁ comprende una mutación por sustitución Q39E (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₁ consiste en la mutación por sustitución Q39E. En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une a CD3 comprende un dominio VH (VH2) que comprende una región cargada (CR₃) y un dominio VL (VL2) que comprende una región cargada (CR₄), en donde la CR₃ en el VH2 forma un par de carga con la CR₄ en el VL2.
15 En algunos aspectos, la CR₃ comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₄ comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR₃ comprende una mutación por sustitución Q39K (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₃ consiste en la mutación por sustitución Q39K. En algunos aspectos, la CR₄ comprende una mutación por sustitución Q38E (numeración de Kabat). En algunos aspectos, la CR₄
20 consiste en la mutación por sustitución Q38E. En algunos aspectos, el dominio VL1 está ligado a un dominio constante de la cadena liviana (CL1) y el VH1 está ligado a un primer dominio constante de la cadena pesada (CH1₁), en donde el CL1 comprende una región cargada (CR₅) y el CH1₁ comprende una región cargada (CR₆), y en donde la CR₆ en el CH1₁ forma un par de carga con la CR₅ en el CL1. En algunos aspectos, la CR₆
25 comprende un residuo de aminoácido básico y la CR₅ comprende un residuo de aminoácido ácido. En algunos aspectos, la CR₆ comprende una mutación por sustitución S183K (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₆ consiste en la mutación por sustitución S183K. En algunos aspectos, la CR₅ comprende una mutación por sustitución V133E (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₅ consiste en la
30 mutación por sustitución V133E.
En otros aspectos, el dominio VL2 está ligado a un dominio CL (CL2) y el VH2 está ligado a un dominio CH1 (CH1₂), en donde el CL2 comprende una región cargada (CR₇) y el CH1₂ comprende una región cargada (CR₈), y en donde la CR₇ en el CL2 forma un par cargado con la CR₈ en el CH1₂. En algunos aspectos, la CR₇ comprende un residuo
35 de aminoácido básico y la CR₈ comprende un residuo ácido. En algunos aspectos, la

CR₇ comprende una mutación por sustitución V133K (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₇ consiste en la mutación por sustitución V133K. En algunos aspectos, la CR₈ comprende una mutación por sustitución S183E (numeración EU). En algunos aspectos, la CR₈ consiste en la mutación por sustitución S183E.

- 5 En otros aspectos, el dominio VL2 está ligado a un dominio CL (CL₂) y el VH2 está ligado a un dominio CH1 (CH₁₂), en donde (a) el CL₂ comprende una o más mutaciones en los residuos de aminoácidos F116, L135, S174, S176 y/o T178 (numeración EU) y (b) el CH₁₂ comprende una o más mutaciones en los residuos de aminoácidos A141, F170, S181, S183 y/o V185 (numeración EU). En algunos aspectos, el CL₂ comprende una o más de las siguientes mutaciones por sustitución: F116A, L135V, S174A, S176F y/o T178V. En algunos aspectos, el CL₂ comprende las siguientes mutaciones por sustitución: F116A, L135V, S174A, S176F y T178V. En algunos aspectos, el CH₁₂ comprende una o más de las siguientes mutaciones por sustitución: A141I, F170S, S181M, S183A y/o V185A. En algunos aspectos, el CH₁₂ comprende las siguientes mutaciones por sustitución: A141I, F170S, S181M, S183A y V185A. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-FcRH5 comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada, en donde el uno o más dominios constantes de la cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH2 (CH₂₁), un primer dominio CH3 (CH₃₁), un segundo dominio CH2 (CH₂₂), y un segundo dominio CH3 (CH₃₂). En algunos aspectos, al menos uno del uno o más dominios constantes de la cadena pesada se empareja con otro dominio constante de la cadena pesada. En algunos aspectos, cada uno del CH₃₁ y del CH₃₂ comprende una protuberancia (P₁) o una cavidad (C₁), y en donde la P₁ o la C₁ en el CH₃₁ se posiciona en la C₁ o la P₁, respectivamente, en el CH₃₂. En algunos aspectos, el CH₃₁ y el CH₃₂ se encuentran en una interfase entre la P₁ y la C₁. En algunos aspectos, cada uno del CH₂₁ y del CH₂₂ comprende (P₂) o una cavidad (C₂), y en donde la P₂ o la C₂ en el CH₂₁ se posiciona en la C₂ o la P₂, respectivamente, en el CH₂₂. En algunos aspectos, el CH₂₁ y el CH₂₂ se encuentran en una interfase entre la P₂ y la C₂.

B. Composiciones y métodos recombinantes

- 30 Los anticuerpos anti-LY6G6D de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3) y/o anticuerpos anti-CD3 de la invención (por ejemplo, 38E4v1 MD1 (MD1) y 38E4v1 MD4 (MD4)) se pueden producir usando métodos y combinaciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 4.816.567. En una forma

de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-LY6G6D descrito en la presente. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas livianas y/o pesadas del anticuerpo). En otra forma de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD3 descrito en la presente. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas livianas y/o pesadas del anticuerpo). En otra forma de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden tales ácidos nucleicos. En otra forma de realización, se proporciona una célula huésped que comprende tales ácidos nucleicos. En una forma de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se transformó con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una forma de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una forma de realización, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-LY6G6D, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporcionó anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-LY6G6D y/o un anticuerpo anti-CD3, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describió anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo).

1. Métodos con dos células para elaborar anticuerpos biespecíficos

En algunos aspectos, un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un TDB LY6G6D, por

ejemplo, un TDB LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) se elabora con un método que comprende dos líneas de células huésped. En algunos aspectos, un primer brazo del anticuerpo (por ejemplo, un primer brazo que comprende una región de ojal) se produce en una primera línea celular huésped, y un segundo brazo del anticuerpo (por ejemplo, un segundo brazo que comprende una región de botón) se produce en una segunda línea celular huésped. Los brazos del anticuerpo se purifican de las líneas de células huésped y se ensamblan *in vitro*.

2. Métodos con una célula para elaborar anticuerpos biespecíficos

En algunos aspectos, un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un TDB LY6G6D, por ejemplo, un TDB LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) se elabora con un método que comprende una sola línea celular huésped. En algunos aspectos, un primer brazo del anticuerpo (por ejemplo, un primer brazo que comprende una región de ojal) y un segundo brazo del anticuerpo (por ejemplo, un segundo brazo que comprende una región de botón) se producen en y se purifican de una sola línea celular huésped. Preferentemente, el primer brazo y el segundo brazo se expresan en niveles comparables en la célula huésped, por ejemplo, ambos se expresan en un alto nivel en la célula huésped. Los niveles similares de expresión aumentan la posibilidad de producción eficaz de TDB y disminuyen la posibilidad de errores de emparejamiento de cadena liviana (LC) de componentes de TDB. El primer brazo y el segundo brazo del anticuerpo pueden comprender cada uno mutaciones por sustitución de aminoácidos que introducen pares de carga, como se describe en la Sección IIB (8) en la presente. Los pares de carga promueven el emparejamiento de pares cognados de cadena pesada y liviana de cada brazo del anticuerpo biespecífico, lo que minimiza los errores de emparejamiento.

3. Células huésped

Las células huésped adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc. Para expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Luego de la expresión,

el anticuerpo se puede aislar de la pasta de célula bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que
5 codifican anticuerpos, que incluyen cepas de hongos y levadura cuyas vías de glucosilación se "humanizaron", lo que generó la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado también
10 derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se identificaron numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos celulares de plantas también se pueden utilizar como huéspedes. Ver, por
15 ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en
20 suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251
25 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células del carcinoma del cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumores de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped
30 de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de líneas de células huésped de determinados mamíferos adecuadas para producción de anticuerpos, ver,
35 por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed.,

Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. *Ensayos*

Los anticuerpos anti-LY6G6D de la invención (por ejemplo, los anticuerpos anti-LY6G6D de la invención que se unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3, tal como anticuerpos TDB de la invención o variantes de estos) que se proporcionan en la presente, se pueden identificar, cribar, o caracterizarse para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en el estado de la técnica.

10 1. *Ensayos de unión y otros ensayos*

En un aspecto, un anticuerpo anti-LY6G6D o anti-CD3 de la invención se evalúa para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por medio de métodos conocidos, tales como ELISA, transferencia Western, etc.

En otro aspecto, los ensayos de competencia se pueden usar para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención para unirse a LY6G6D o para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención para unirse a CD3.

En un ensayo de competencia de ejemplo, LY6G6D inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une a LY6G6D y un segundo anticuerpo no etiquetado que se evalúa para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por LY6G6D. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como un control, LY6G6D inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo etiquetado pero no el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a LY6G6D, se retira el exceso de anticuerpo sin unir, y se mide la cantidad de etiqueta asociada con LY6G6D inmovilizado. Si la cantidad de etiqueta asociada con LY6G6D inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces significa que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión a LY6G6D. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Otro ensayo de competencia de ejemplo comprende CD3 inmovilizada y un primer anticuerpo etiquetado que se une a CD3, en donde el ensayo se lleva a cabo como se describe anteriormente.

2. *Ensayos de actividad*

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-LY6G6D de

estos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión a LY6G6D (por ejemplo, LY6G6D en la superficie de un tumor), o un fragmento de péptido de este, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-LY6G6D multiespecífico (por ejemplo, biespecífico) de la invención (por ejemplo, un anticuerpo contra TDB que tiene un brazo anti-LY6G6D, por ejemplo, 20A12.QNTv12, y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, CD3), la actividad biológica también puede incluir, por ejemplo, la activación de células efectoras (por ejemplo, activación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+)), la expansión de la población de células efectoras (es decir, un aumento en el recuento de linfocitos T), la reducción de la población de células diana (es decir, una disminución en la población de células que expresan LY6G6D en sus superficies celulares), y/o la inactivación de células diana. Se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* e/o *in vitro*. En algunas formas de realización, se evalúa un anticuerpo de la invención para dicha actividad biológica, como se describe en detalle en los Ejemplos de la presente.

Además, las células se pueden lavar en medio RPMI que contiene 10 % de FBS, enriquecido con GlutaMax, penicilina y estreptomicina y ~0,2 millones de células suspendidas agregadas a una placa de 96 cavidades con fondo en U. Las células se pueden cultivar en RPMI1640 enriquecido con 10 % de FBS a 37 °C en una incubadora humidificada de cultivo celular estándar. Para los ensayos de inactivación de células BJAB, se pueden incubar 20.000 células BJAB con células efectoras, ya sea como linfocitos T huPBMC o purificados, como las relaciones indicadas por ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos contra TDB durante 24 horas.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-LY6G6D y/o un anticuerpo anti-CD3 conjugado en la presente con uno o más agentes citotóxicos tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas), o isótopos radioactivos.

En una forma de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que el anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, que incluyen, entre otros, un maitansinoide (ver las patentes estadounidenses N.^{os} 5.208.020, 5.416.064 y las patentes europeas EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como porciones de fármacos de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las patentes estadounidenses

N.^{os} 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de esta (ver las patentes estadounidenses N.^{os} 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente estadounidense N.^o 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-LY6G6D y/o un anticuerpo anti-CD3 como se describe en la presente conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de esta, que incluye, entre otros, la cadena A de difteria, los fragmentos activos que no son de unión de la toxina de difteria, la cadena A de etotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abríñ, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-LY6G6D y/o un anticuerpo anti-CD3 como se describe en la presente conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos está disponible para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa un radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o una etiqueta giratoria para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también denominada imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden realizarse utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de

disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético etiquetado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil al ácido, un ligador sensible a la peptidasa, un ligador fotolábil, un ligador de dimetilo o un ligador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente estadounidense N.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en la presente contemplan expresamente, entre otros, los conjugados preparados con reactivos de reticulación que incluyen, entre otros, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles en el comercio (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Métodos y composiciones para diagnósticos y detección

En algunas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-LY6G6D y/o anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3) es útil para detectar la presencia de LY6G6D y/o CD3 en una muestra biológica. Como se usa en la presente, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En algunas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D para usar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de LY6G6D en una muestra biológica. En algunas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-LY6G6D descrito en la presente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-LY6G6D a LY6G6D, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-LY6G6D y LY6G6D. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para usar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CD3 en una muestra biológica. En algunas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3 descrito en la presente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-CD3 a CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y CD3. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-LY6G6D y/o anti-CD3 etiquetados. Las etiquetas incluyen, entre otras, etiquetas o porciones que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), así como porciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las etiquetas de ejemplo incluyen, entre otras, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas giratorias, etiquetas de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-LY6G6D y/o un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3) se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Por lo general, los portadores farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, entre otros: amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como

cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol de fenol, butilo o bencilo; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10
5 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones
10 formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables de ejemplo de la presente también incluyen agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas hialuronidasas solubles activas a pH neutro (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas
15 hialuronidasas solubles PH 20 humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Algunas SHASEGP de ejemplo y los métodos para su uso, que incluyen rHuPH20, se describen en la publicación de patente estadounidense N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, SHASEGP se combina con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tal como condroitinasas.

20 Se describen ejemplos de formulaciones de anticuerpos liofilizadas en la patente estadounidense N.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente estadounidense N.º 6.171.586 y WO2006/044908, y las formulaciones de esta última incluyen un amortiguador de histidina-acetato.

La formulación en la presente también puede contener más de un ingrediente activo,
25 según sea necesario, para la afección particular que se trata, preferentemente, aquellos que tienen actividades complementarias que no se perjudican de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar también un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento y/o un agente antihormonal, tal como los mencionados
30 anteriormente en la presente). Dichos ingredientes activos se encuentran en una combinación adecuada en una cantidad eficaz para el fin previsto.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-
35 (metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del

fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Osol, A. Ed., (1980).

Se pueden elaborar preparados de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de
5 preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Por lo general, las formulaciones para usar en la administración *in vivo* son estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de
10 membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos anti-LY6G6D y/o anticuerpos anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-LY6G6D biespecíficos de la invención que se unen a LY6G6D, preferentemente, con alta afinidad (por ejemplo, 20A12.QNTv12), y una
15 segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3, preferentemente, con alta afinidad, por ejemplo, TDB LY6G6D que tienen un brazo anti-Ly6G6D, tal como 20A12.QNTv12, y un brazo anti-CD3, tal como 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) se pueden usar en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D para usar como un
20 medicamento. En otros aspectos, se proporcionan un anticuerpo anti-LY6G6D, por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12) para usar en el tratamiento o el retraso de la progresión de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tipo de cáncer, por ejemplo, un cáncer colorrectal). En algunas formas de realización, el tipo de cáncer es un cáncer que expresa LY6G6D (por ejemplo, un cáncer colorrectal
25 que expresa LY6G6D). En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D para usar en un método de tratamiento. En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D (por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-
30 Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) para usar en un método para tratar a un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-LY6G6D. En dicha forma de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más
35 adelante. En otras formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-

LY6G6D (por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) para usar en la mejora de una función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular. En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6G6D para usar en un método para mejorar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-LY6G6D, (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D biespecífico de la invención que se une a una segunda molécula biológica, por ejemplo, CD3), (por ejemplo, para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras, reducir una célula diana (por ejemplo, una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención, tal como una población de un anticuerpo contra TDB biespecífico de la invención), y/o inactivar una célula diana (por ejemplo, célula tumoral diana). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-LY6G6D en la elaboración o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tipo de cáncer, por ejemplo, un cáncer colorrectal). En algunas formas de realización, el tipo de cáncer es un cáncer que expresa LY6G6D (por ejemplo, un cáncer colorrectal que expresa LY6G6D). En una forma de realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo celular que comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En dicha forma de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante. En otra forma de realización, el medicamento es para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, tales como linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras, reducir una población de células diana (por ejemplo, una población de células que expresan LY6G6D), y/o inactivar células diana (por ejemplo, células tumorales diana) en el individuo. En una forma de realización, el medicamento es para usar en un método para mejorar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras,

reducir una población de células diana (por ejemplo, una población de células que expresan LY6G6D), y/o inactivar una célula diana (por ejemplo, célula tumoral diana). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un ser humano.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, un tipo de cáncer, por ejemplo, un cáncer colorrectal). En algunas formas de realización, el tipo de cáncer es un cáncer que expresa LY6G6D (por ejemplo, un cáncer colorrectal que expresa LY6G6D). En una forma de realización, el método comprende administrar to a un individuo que tiene dicho trastorno proliferativo celular
- 10 una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LY6G6D, por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12). En dicha forma de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante. Un "individuo" de
- 15 acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un ser humano.

- En otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-
- 20 LY6G6D (por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras, reducir una población de células diana (por ejemplo, una población de células que expresan
- 25 LY6G6D), y/o inactivar una célula diana (por ejemplo, célula tumoral diana). En una forma de realización, un "individuo" es un ser humano.

- En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de intestino grueso o un adenocarcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal,
- 30 adenocarcinoma gástrico o adenocarcinoma pancreático), que puede ser adenocarcinoma metastásico (por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal metastásico, adenocarcinoma gástrico metastásico o adenocarcinoma pancreático metastásico), mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención, tal como un anticuerpo contra TDB biespecífico de la invención, tal como un
- 35 anti-Ly6G6D que actúa sobre TDB, tal como un TBD Ly6G6D que tiene un brazo anti-

CD3 de alta afinidad, tal como 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4, y un brazo anti-Ly6G6D, tal como 20A12.QNTv12. En algunos aspectos, el tipo de cáncer tiene un estado de inestabilidad de microsatélites de “microsatélite estable” (“MSS”) o “inestabilidad de microsatélites baja” (“MSI-L”). En otros aspectos, el tipo de cáncer tiene un estado de inestabilidad de microsatélites de “inestabilidad de microsatélites alta” (“MSI-H”). En algunos aspectos, el tipo de cáncer expresa LY6G6D.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar un cáncer colorrectal, por ejemplo, un cáncer colorrectal que tiene un estado de inestabilidad de microsatélites de “microsatélite estable” (“MSS”) o “inestabilidad de microsatélites baja” (“MSI-L”), mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LY6G6D de la invención, tal como un anticuerpo contra TDB biespecífico de la invención, tal como un anti-Ly6G6D que actúa sobre TDB, tal como un TBD Ly6G6D que tiene un brazo anti-CD3 de alta afinidad, tal como 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4, y un brazo anti-Ly6G6D, tal como 20A12.QNTv12.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-LY6G6D proporcionados en la presente (por ejemplo, TBD LY6G6D que tienen un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)), por ejemplo, para usar en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-LY6G6D proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-LY6G6D proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe en la presente.

Un anticuerpo de la invención (y/o cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra mediante administración intravenosa. En otras formas de realización, el anticuerpo se administra mediante administración subcutánea. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D administrado mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en un paciente que el mismo anticuerpo anti-LY6G6D administrado mediante inyección intravenosa. La dosis puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como

inyecciones intravenosas o subcutáneas, en función de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varios cronogramas de dosis, que incluyen, entre otras, administraciones simples o múltiples durante diversos puntos temporales, administración por bolo e infusión de pulso.

- 5 Los anticuerpos de la invención se pueden formular, dosificar y administrar de acuerdo con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores
- 10 conocidos por los profesionales de la salud. No es necesario que el anticuerpo se formule con uno o más agentes que se usan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, pero opcionalmente puede formularse de esa manera. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente.
- 15 Estos se usan por lo general en las mismas dosis y con las vías de administración descritas en la presente, o de alrededor de 1 a 99 % de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía que se determine adecuada de manera empírica/clínica.

- Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un
- 20 anticuerpo de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D, por ejemplo, un TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos) dependerá del tipo de enfermedad que se desea tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución
- 25 de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

- Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-
- 30 LY6G6D (por ejemplo, TBD LY6G6D que tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) administrada al ser humano va a estar en el rango de alrededor de 0,01 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones. En algunas formas de realización, el anticuerpo usado es de alrededor de 0,01 a
- 35 alrededor de 45 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 40 mg/kg, de alrededor de

0,01 a alrededor de 35 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 30 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 25 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 20 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 15 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 0,01 a alrededor de 5 mg/kg, o de alrededor de 0,01 a
5 alrededor de 1 mg/kg administrado diariamente, por ejemplo. En una forma de realización, un anticuerpo anti-LY6G6D descrito en la presente se administra a un ser humano en una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de
10 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de ciclos de 21 días. La dosis se puede administrar como una sola dosis o como múltiples dosis (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tales como infusiones. En el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, según la afección, el tratamiento se sostendría por lo general hasta que se produzca una inhibición deseada
15 de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Estas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, una vez a la semana o cada tres
20 semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-LY6G6D). Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. El progreso de este tratamiento se monitorea fácilmente con técnicas y ensayos convencionales.

25 H. Agentes terapéuticos adicionales

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solas o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En algunas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente
30 inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, un agente usado en tratamiento de radiación, un agente anti-angiogénesis, un agente apoptótico, un agente anti-tubulina u otro agente, tal como un antagonista de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de la tirosina quinasa), un inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (TARCEVA™), un inhibidor del factor de crecimiento derivado de
35 plaquetas (por ejemplo, GLEEVEC™ (Imatinib Mesylate)), un inhibidor de COX-2 (por

ejemplo, celecoxib), interferón, citocina, un anticuerpo que no es el anticuerpo anti-CD3 de la invención, tal como un anticuerpo que se une a una o más de las siguientes dianas de los receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF o VEGF, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente químico bioactivo u orgánico.

5 Los tratamientos conjuntos mencionados anteriormente incluyen la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o distintas formulaciones), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En una forma de
10 realización, la administración del anticuerpo anti-LY6G6D y la administración de un agente terapéutico adicional se producen dentro de alrededor de un mes, o alrededor de una, dos o tres semanas, o dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos anti-LY6G6D de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-LY6G6D biespecífico de la invención que se une a una segunda molécula biológica,
15 por ejemplo, CD3) también se pueden usar en combinación con tratamiento de radiación. En algunas formas de realización, el tratamiento adicional puede ser cirugía, tratamiento génico, tratamiento de ADN, tratamiento viral, tratamiento de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, tratamiento de anticuerpos monoclonales o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser
20 en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunas formas de realización, el tratamiento adicional es la administración de un inhibidor enzimático de moléculas pequeñas o un agente anti-metastásico. En algunas formas de realización, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados para disminuir la aparición y/o la gravedad de los
25 efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antináuseas, etc.). En algunas formas de realización, el tratamiento adicional es cirugía. En algunas formas de realización, el tratamiento adicional es una combinación de tratamiento de radiación y cirugía.

En algunas formas de realización, un TBD Ly6G6D (por ejemplo, un TDB LY6G6D que
30 tiene un brazo anti-CD3 (por ejemplo, 38E4.v1 MD1 o 38E4.v1 MD4) y un brazo anti-Ly6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12)) se coadministra (de manera concurrente, como composiciones únicas o múltiples (por ejemplo, formulaciones)) con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todos de los 11 de los siguientes: FOLFOX (oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-
35 fluorouracil y leucovorina), capecitabina (XELODA®), 5-fluorouracil (5-FU), CapeOx

(XELOX; capecitabina con oxaliplatino), leucovorina (ácido folínico), bevacizumab (AVASTIN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), regorafenib (STIVARGA®), irinotecán (CPT-11; CAMPTOSAR®), y FLOX (5-fluorouracil con oxaliplatino). En otras formas de realización, un TBD Ly6G6D se administra antes de uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todos de los 11 de los siguientes: FOLFOX (oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-fluorouracil y leucovorina), capecitabina (XELODA®), 5-fluorouracil (5-FU), CapeOx (XELOX; capecitabina con oxaliplatino), leucovorina (ácido folínico), bevacizumab (AVASTIN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), regorafenib (STIVARGA®), irinotecán (CPT-11; CAMPTOSAR®), y FLOX (5-fluorouracil con oxaliplatino). En otras formas de realización, un TBD Ly6G6D se administra después de uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todos de los 11 de los siguientes: FOLFOX (oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-fluorouracil y leucovorina), capecitabina (XELODA®), 5-fluorouracil (5-FU), CapeOx (XELOX; capecitabina con oxaliplatino), leucovorina (ácido folínico), bevacizumab (AVASTIN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), regorafenib (STIVARGA®), irinotecán (CPT-11; CAMPTOSAR®), y FLOX (5-fluorouracil con oxaliplatino).

i. Agentes inhibidores del crecimiento

En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional es un agente inhibidor del crecimiento. Los agentes inhibidores del crecimiento de ejemplo incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular en un lugar distinto de la fase S, por ejemplo, los agentes que inducen la interrupción de G1 (por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifén, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracil o ara-C) o la interrupción de la fase M (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido o bleomicina).

ii. Tratamientos de radiación

En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional es un tratamiento de radiación. Los tratamientos de radiación incluyen el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir daño suficiente a una célula y limitar su capacidad de funcionar de manera normal o destruir completamente la célula. Los tratamientos comunes se proporcionan como una administración única y las dosis comunes varían de 10 a 200 unidades (Grays (Gy)) por día.

iii. Agentes citotóxicos

En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, por ejemplo, una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o genera la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, entre otros, isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes quimioterapéuticos o fármacos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes de intercalación); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de estos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de estas; y agentes antitumorales o antineoplásicos.

iv. Agentes inmunomoduladores

En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, por ejemplo, un antagonista de unión a eje PD-L1, que puede ser un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-L2. PD-1 (muerte programada 1) también se denomina en el estado de la técnica “muerte celular programada 1,” “PDCD1,” “CD279” y “SLEB2”. Una PD-1 humana de ejemplo se muestra en UniProtKB/Swiss-Prot n.º acceso Q15116. PD-L1 (ligando de muerte programada Ligando 1) también se denomina en el estado de la técnica “ligando 1 de muerte celular programada 1,” “PDCD1LG1,” “CD274,” “B7-H” y “PDL1”. Una PD-L1 humana de ejemplo se muestra en UniProtKB/Swiss-Prot n.º acceso Q9NZQ7.1. PD-L2 (ligando 2 de muerte programada 1) también se denomina en el estado de la técnica “ligando 2 de muerte celular programada 1,” “PDCD1LG2,” “CD273,” “B7-DC,” “Btdc” y “PDL2”. Una PD-L2 humana de ejemplo se muestra en UniProtKB/Swiss-Prot n.º acceso Q9BQ51. En algunos casos, PD-1, PD-L1 y PD-L2 son PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos.

En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus componentes de unión. En un aspecto específico, los componentes de unión al ligando de PD-1 son PD-L1 y/o PD-L2. En otro caso, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus ligandos de unión. En un aspecto específico, los componentes de unión a PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otro caso, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus componentes de unión al ligando. En un aspecto específico, el componente de unión al ligando de PD-L2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de este, una inmunoadhesina, una proteína de fusión o un oligopéptido.

En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico).

En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, como se describe más adelante. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpos seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano.

En algunos aspectos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista dirigido contra una molécula coinhibidora (por ejemplo, un antagonista CTLA-4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4), un antagonista TIM-3 (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM-3), o un antagonista LAG-3 (por ejemplo, un anticuerpo anti-LAG-3)), o cualquier combinación de estos.

En algunos aspectos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista dirigido contra TIGIT (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIGIT).

En algunos aspectos, el agente terapéutico adicional es 5-fluorouracil (5-FU); irinotecán; capecitabina; oxaliplatino; cetuximab; bevacizumab; panitumumab; aflibercept, regorafenib; ramucirumab, TAS-102 (trifluridina y tipiracil); pembrolizumab; nivolumab; nivolumab e ipilimumab; vemurafenib; FOLFOXIRI y bevacizumab, un tratamiento con anti-EGFR en combinación con un inhibidor de BRAF y/o MEK, que incluye opcionalmente un agente citotóxico; FOLFOX/FOLFIRI y un tratamiento con anti-EGFR; o FOLFOX/FOLFIRI/FOLFOXIRI y bevacizumab.

I. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto del envase en el recipiente o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz, por sí misma o en combinación con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa

de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en esta forma de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. De manera adicional o alternativa, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. EJEMPLOS

A continuación, se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Cabe destacar que diversos otros aspectos se pueden poner en práctica de acuerdo con la descripción general proporcionada anteriormente, y los ejemplos no limitan el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1. LY6G6D es un marcador de superficie de células de cáncer colorrectal y tiene expresión limitada en tejidos normales

La expresión del miembro G6D de la familia de antígenos linfocitos 6 (LY6G6D) (SEQ ID NO: 75) en tejidos normales y tumorales humanos se evaluó con The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Grossman et al., *New England Journal of Medicine*, 375(12): 1109-1112) y Genotype-Tissue Expression Project (GTEx) data (Pierson et al., *PLoS Comput Biol*, 11, e1004220, 2015) e inmunohistoquímica (IHC).

A. Expresión de LY6G6D

La Figura 1A muestra la expresión de LY6G6D y el miembro G6F de la familia de antígenos linfocito 6 (LY6G6F) en tejidos normales y tumorales en tejidos humanos en los datos de TCGA. En los tejidos tumorales, la indicación de la mayor expresión de LY6G6D es colon, y LY6G6D se sobreexpresa significativamente solo en el tejido tumoral del colon. Los tejidos normales del colon también muestran alguna expresión de LY6G6D, aunque en niveles mucho más bajos. Cabe destacar que la expresión (>1

nRPKM) de LY6G6F se encuentra en mayor medida en el tejido tumoral del colon. La Figura 1B muestra la expresión de LY6G6D y LY6G6F en tejidos normales en datos públicos del proyecto GTEx. LY6G6D se expresa en mayor medida en el tejido de próstata, testículos, cuello uterino y vagina, y la expresión considerable se encuentra en el tejido normal del colon y en un subconjunto de muestras de piel. LY6G6F se expresa en mayor medida en la sangre, luego en el tejido de testículos, bazo, tiroides y pulmón.

B. Expresión de LY6G6D en CRC de MSS y MSI-L

LY6G6D se expresa en mayor medida en tipos de cáncer colorrectal (CRC) que tiene un estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) de microsatélite estable (MSS), inestabilidad de microsatélites baja (MSI-L) o inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H); los CRC de MSS se asocian a un peor pronóstico (Figura 1C).

C. Tinción de IHC de LY6G6D

Los tumores de CRC humano se tiñeron para determinar LY6G6D. Alrededor de 20 % de casos primarios de CRC se identificó como que expresa LY6G6D mediante IHC. Se evaluaron 141 tumores primarios de colon de micromatriz de tejido (TMA). 21 tumores mostraron tinción de IHC leve (1+) (14 %), 5 mostraron tinción moderada (2+) y 4 mostraron tinción fuerte (3+) (6-7 % combinado) (Figura 2A). Las Figuras 2B-2D muestran tinción de IHC leve (1+), moderada (2+) y fuerte (3+) para LY6G6D en tejido de tumor primario de colon.

Ejemplo 2. Desventajas de la elaboración en el brazo anti-LY6G6D 1G4 , la generación de clon anti-LY6G6D, mapeo de epítipo y humanización

A. Desventajas de la elaboración en el brazo anti-LY6G6D 1G4

Los TBD anti-LY6G6D que comprenden el brazo anti-LY6G6D 1G4 quimérico y un brazo anti-CD3 38E4.v1 demostraron la inactivación *in vitro* de células HT55 (línea de células de carcinoma de colon humano) (Figura 3A) y actividad *in vivo* contra tumores de xenoinjerto LS1034 y HT55 en ratones NSGTM (Figura 3B). 1G4 es un anticuerpo de hibridomas de ratón; 1G4 quimérico (ch1G4) es un anticuerpo quimérico humano/de ratón en el que los dominios variables de ratón (VH y VL) de 1G4 se fusionaron genéticamente con dominios constantes de la cadena pesada humana, respectivamente (CH1, CH2 y CH3) que tienen una mutación por sustitución de aminoácido de N297G en CH2 y que comprende una región “de ojal” y un dominio constante de la cadena liviana humana (CL). Se generó una versión humanizada del brazo 1G4 y mostró eficacia *in vitro* e *in vivo* (Figuras 3C y 3D).

Se identificó una desventaja de la evaluación molecular (MA) para el residuo de aminoácido W50 de CDR2 de la cadena liviana (LC) 1G4 humanizada (WASTRIS; SEQ

ID NO: 110). En resumen, la IG4 humanizada se evaluó para demostrar condiciones químicas en tensión con AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidrocloruro), una molécula pequeña conocida por generar radicales libres (ver, por ejemplo, Ji et al., *J. Pharm. Sci.* 98(12):4485-4500, 2009), así como en condiciones térmicas en pH variado (una prueba de tensión térmica de dos semanas a 40 °C, pH 5,5). El residuo de la cadena liviana W50 se identificó por tener mayor oxidación (72,0 % de oxidación) luego de la tensión de AAPH.

Los ensayos de tensión térmica imitan la estabilidad en la semivida del producto. Las muestras se intercambiaron mediante amortiguador en 20 mM de His acetato, 240 mM de sacarosa, pH 5,5 y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml. Un ml de cada muestra se sometió a tensión a 40 °C durante 2 semanas, y un segundo ml se almacenó a -70 °C como un control. Ambas muestras se digirieron con tripsina para crear péptidos que se pueden analizar usando análisis de cromatografía de líquidos (LC) - espectrometría de masas (MS). Para cada péptido en la muestra, se adquirieron el tiempo de retención (como se mide con el uso de cromatografía de líquidos) y la información de la fragmentación de iones de péptido y de masa de alta resolución (información de secuencia de aminoácidos). Se generaron cromatogramas de iones extraídos (XIC) para péptidos de interés (por ejemplo, iones de péptidos modificados y nativos) de los conjuntos de datos en una ventana de +/-10 ppm, y se integraron picos para determinar el área. Los porcentajes de modificación relativos se calcularon para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividida por (área del péptido modificado más el área del péptido nativo) multiplicada por 100).

Además, el brazo 1G4 no pasó un ensayo de transfección transitoria para la producción (Figura 30). W50 se reemplazó con los 18 aminoácidos alternativos (que excluyen Cys), pero la afinidad de unión pareció estar impactada por el reemplazo. Por último, como se muestra en la Figura 3A, el brazo 1G4 es eficaz solo cuando se empareja con el brazo 38E4.v1 de alta afinidad, pero no cuando se empareja con 40G5c de baja afinidad. De este modo, se llevó a cabo una nueva campaña de descubrimiento para los anticuerpos anti-LY6G6D.

B. Generación de mAb anti-huLY6G6D de conejo

Los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-LY6G6D humano (huLY6G6D) se generaron en conejos. Los conejos blancos de Nueva Zelanda se inmunizaron con Ly6G6D humano, y los linfocitos B únicos se aislaron de los conejos inmunizados usando un protocolo modificado de Offner et al. *PLoS ONE*, 9(2), 2014. Este flujo de trabajo modificado incluyó clasificación FACS directa de linfocitos B IgG+ huLy6G6D+ en

cavidades simples. Los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B se evaluaron mediante ELISA para determinar la unión a Ly6G6D humana y una proteína de control irrelevante. Los linfocitos B específicos para Ly6G6D se lisaron y se congelaron de inmediato a -80 °C para su almacenamiento hasta la clonación molecular. Las regiones variables (VH y VL) de cada anticuerpo monoclonal de linfocito B de conejo se clonaron en vectores de expresión de mRNA como se describió anteriormente (Offner et al. *PloS ONE*, 9(2), 2014). Los anticuerpos de conejo recombinantes individuales se expresaron en células Expi293 y se purificaron posteriormente con proteína A. Los anticuerpos anti-Ly6G6D purificados se sometieron luego a los ensayos de actividad funcional y al cribado cinético. Se generaron alrededor de 280 clones anti-Ly6G6D ELISA+. Se agruparon posteriormente 96 clones en cuatro grupos distintos de agrupamiento de epítomos, como se describe a continuación.

C. Análisis cinético y agrupamiento de epítomos anti-LY6G6D con el uso de LY6G6D modificado con glucosilación por ingeniería genética

Un sistema de generación de imágenes SPR basado en matriz (Carterra®, Estados Unidos) se usó para la evaluación cinética y el agrupamiento de epítomos de un panel de 96 anticuerpos monoclonales anti-huLY6G6D de conejo, que incluye 1G4. Para el agrupamiento de epítomos, se modificaron por ingeniería genética polipéptidos LY6G6D para introducir sitios de glucosilación por la superficie de la molécula (Figuras 4A y 4B). Los sitios se seleccionaron para que sea más simple agregar el sitio de glucosilación con interrupción mínima de la secuencia natural. Los anticuerpos anti-LY6G6D candidatos se evaluaron para determinar la interacción con los polipéptidos LY6G6D modificados con glucosilación por ingeniería genética (Figura 4B). Los anticuerpos purificados se diluyeron a 10 µg/ml en 10 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 4,5. Con el uso de acoplamiento de aminas, los anticuerpos se inmovilizaron directamente en un chip CMD 200M de sensorprisma SPR (XanTec Bioanalytics, Alemania) con el uso de SPRI-Continuous Flow Microspotter™ (Carterra®, Estados Unidos) para crear una matriz de 96 anticuerpos. Para el análisis, se usó IBIS MX96 SPRI (Carterra®, Estados Unidos) para evaluar analitos que se unen a ligandos inmovilizados. Para el análisis cinético, se inyectó Ly6G6D humano durante 3 minutos de 0 a 300 nM en dilución de 3 veces, seguido de un período de disociación de 10 minutos. Para el agrupamiento de epítomos, cada mutante de glucosilación de Ly6G6D humano se inyectó por primera vez durante 4 minutos a 50 nM, seguido de una segunda inyección de 4 minutos de anticuerpo monoclonal individual a 10 µg/ml. La superficie se regeneró con 10 mM de glicina, pH 1,5 entre ciclos. El experimento se llevó a cabo a 25

°C en un amortiguador de corrida de amortiguador HBS-T (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05 % de tensioactivo P20). Los datos cinéticos se procesaron usando Scrubber 2.0 (BioLogic Software), y los datos de agrupamiento de epítomos se procesaron con el uso de la herramienta de *software* de agrupamiento Wasatch (Carterra®, Estados Unidos).

El agrupamiento de 1G4 y el anticuerpo anti-LY6G6D de conejo 20A12 con el polipéptido LY6G6D se interrumpió en el polipéptido LY6G6D modificado con glucosilación por ingeniería genética que tiene mutaciones por sustitución de aminoácidos G99N.L101S (Figura 4B). La unión de otros anticuerpos anti-LY6G6D de conejo se interrumpió de diversas maneras mediante las mutaciones por sustitución de aminoácidos P60A.P61S, A73N.H75S, V80S, V80N, T82N o D87N (Figura 4B). Los clones de anticuerpo de conejo y 1G4 se colocaron en cuatro grupos de epítomos distintos en base a los resultados del ensayo de modificación con glucosilación por ingeniería genética (Figura 4E): El Grupo 1 incluye tres grupos de secuencias e incluye 1G4, 20A12, 6E10 y 4H7; el Grupo 4 incluye seis grupos de secuencias e incluye f.16D7; y los Grupos 3 y 4 incluyen cada uno tres grupos de secuencias. Los residuos de aminoácidos afectados por mutaciones por glucosilación están codificados por color y los Grupos 1, 2, 3 y 4 se indican mediante subrayado en la Figura 4D (SEQ ID NO: 88). Los anticuerpos anti-LY6G6D 1G4 y 16D7 agrupan epítomos en lados opuestos del antígeno, como se muestra en la Figura 4C.

D. *Ensayos de citotoxicidad a base de células*

Para evaluar la capacidad del nuevo panel de anticuerpos de conejo para actuar sobre una línea de células tumorales que expresan Ly6G6D, se generaron anticuerpos dependientes de linfocitos T biespecíficos (TDB) que comprenden un brazo anti-CD3 40G5c emparejado con diferentes brazos anti-LY6G6D de conejo. Los anticuerpos de conejo representativos de cada grupo de epítomos (Grupo 1, 2, 3 y 4) se volvieron a formatear en semianticuerpos que tienen una región Fc que comprende una región “botón”, dominios variables de conejo quiméricos y dominios constantes humanos que tienen mutaciones N297G y T366W. Después de la purificación, los brazos anti-LY6G6D “botón” se hibridaron con un brazo anti-CD3 40G5c que tiene una región Fc que comprende una región “ojal” y se sometieron a ensayo para determinar la unión a, y la inactivación *in vitro* de, células HT55 (Figuras 4F, 4G y 13A-13E). Se descubrió que los anticuerpos de conejo del Grupo 1 (por ejemplo, 20A12 y 6E10), el grupo que incluyó 1G4, son los más eficaces en la unión y la inactivación de células HT55.

E. *Análisis cinético*

La afinidad de unión de los anticuerpos anti-LY6G6D de conejo a LY6G6D se determinó usando una máquina BIAcore™ T200 (GE Healthcare Life Sciences). En resumen, los chips CM5 de grado de investigación BIAcore™ se activaron con reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para las mediciones cinéticas, la proteína Ly6G6D se acopló a los chips para alcanzar aproximadamente 100 unidades de respuesta (RU) en cada célula de flujo. Los grupos de acoplamiento sin reaccionar se bloquearon con 1M de etanolamina. Los anticuerpos de conejo se expresaron como fragmentos de unión al antígeno (Fab) quiméricos con dominios variables de conejo y dominios constantes humanos. Diluciones en serie de 10 veces de Fab se inyectaron en amortiguador HBS-P a 37 °C con una velocidad de flujo de 30 µl/min. Las velocidades de asociación (ka) y velocidades de disociación (kd) se calcularon usando un modelo de unión Langmuir 1:1 (BIAcore™ T200 Evaluation Software versión 2.0). La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la relación kd/ka (Figura 4H).

15 *F. Humanización de anticuerpos de conejo*

Los anticuerpos 20A12 y 6E10 monoclonales de conejo del Grupo 1 se humanizaron como se describe a continuación. Los números de residuo son de acuerdo con Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5.a Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

20 Humanización de 20A12

Un desafío en la humanización de anticuerpos de conejo es que las diferencias entre las secuencias humanas y de conejo son mayores que entre las secuencias humanas y de roedores. Las regiones estructurales múltiples se aplicaron de este modo para la humanización de 20A12.

25 Las regiones hipervariables de cada uno de los anticuerpos de conejo, a saber, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio VL y las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio VH, se injertaron en dos regiones estructurales del aceptor humano. Las variantes de la cadena liviana rb.20A12 se generaron a base de las secuencias de la línea germinal de la cadena liviana humana

30 HIGHV.1-5, hIGKV.1-39 y hIGKV.4-1, y las variantes de la cadena pesada rb.20A12 se generaron a base de las secuencias de la línea germinal de la cadena pesada hIGHV.3-23 y hIGHV.3-30 (Figuras 31B, 31C y 40A). Estas secuencias de la línea germinal se seleccionaron a base de su alta prevalencia en suero e identidad de alta secuencia con respecto a rb.20A12 (Figuras 31C y 31D). VL CDR KV1-5*01 y VH CDR HV3-23*01 se

35 seleccionaron para un análisis adicional. La secuencia 20A12 que comprende regiones

estructurales completamente humanas se muestra como L2H10 en la Figura 32D.

Las variantes 20A12 humanizadas se evaluaron como Fab. Las regiones estructurales de la línea germinal humana (VL y VH) se modificaron en todas las posiciones de Vernier de conejo hipotéticas de modo que cada posición de Vernier comprenda el aminoácido presente en la secuencia de anticuerpos de conejo (es decir, rb20A12). Las posiciones de Vernier de conejo se identificaron en función de posiciones de Vernier de roedores conocidas. La variante en la que todas las posiciones de Vernier de la cadena liviana y la cadena pesada se invirtieron en el aminoácido de conejo se denomina L1H1 (hu20A12.L1H1) en la Figura 32D. La variante en la que todas las posiciones de Vernier de conejo de la cadena pesada y la cadena liviana comprenden el aminoácido humano se denomina L2H10. Para evaluar si cada posición de Vernier de conejo afecta la afinidad de unión del anticuerpo o huLY6G6D, las posiciones de Vernier de conejo se invirtieron de manera individual en el aminoácido de la secuencia humana correspondiente, es decir, KV1-5*01 o HV3-23*01. Se realizaron una variante de la cadena liviana, L2, y ocho variantes de la cadena pesada adicionales, H2-H9. L2 comprende una mutación por sustitución de aminoácido P43A con respecto a la secuencia KV1-5*01. H2-H9 comprenden, respectivamente, mutaciones por sustitución de aminoácido Q2V, I48V, A49S, K71R, S73N, V78L, F91Y y P105R con respecto a la secuencia HV3-23*01. La afinidad de unión de las variantes de anticuerpos se comparó con la del clon parental que comprende secuencias estructurales completamente humanas (L2H10) mediante un ensayo BIAcore (Figura 32D). Se determinó que los residuos de la cadena pesada de conejo S73, T76, V78 y P105 fueron residuos clave de Vernier de conejo a base de evaluación de afinidad de unión de la variante de anticuerpos descrita anteriormente.

La Figura 32C muestra una versión pulida de 20A12 humanizado que comprende los residuos de la cadena pesada de conejo S73, T76, V78 y P105, y los residuos humanos en todas las demás posiciones de Vernier de conejo. El 20A12 humanizado pulido también se modificó para comprender las sustituciones de aminoácidos C35S o C35I y C50A, como se describe a continuación. Los residuos de Vernier de conejo S73, V78 y P105, el residuo de Vernier de conejo T76 adicional, y las sustituciones de aminoácidos C35S y C50A también se injertaron en la línea germinal humana HV3-30*1 para generar una versión pulida, humanizada adicional de rb.20A12.

Alrededor de 20-40 % de anticuerpos de conejo contiene residuos extra de cisteína. Por ejemplo, el clon 20A12 de conejo contiene un par de cisteínas en CDR-H1 y CDR-H2 (C35 en CDR-H1 y C50 en CDR-H2) (Figura 31A; Figura 40B). Las cisteínas en estas

dos posiciones se encuentran normalmente y se cree que forman un enlace de disulfuro. Con el fin de eliminar el par de cisteínas, que puede ser una desventaja en el desarrollo, C35 y C50 de rb.20A12 mutaron de manera simultánea a C35S-C50A, C35S-C50S, C35I-C50A, C35I-C50S, C35I-C50I y C35G-C50T, y se evaluó a las variantes para determinar la unión a LY6G6D. Cada una de las variantes se evaluaron en la forma de Fab quiméricos con dominios variables de conejo y regiones constantes humanas. Se descubrió que la variante rb20A12.1A (C35I-C50A) retiene la mayor parte de la afinidad del origen (K_D 0,86 nM) (Figuras 34A y 34C). Las mutaciones C35I-C50A se incluyeron de este modo en la secuencia de la cadena pesada 20A12 humanizada pulida descrita en la presente.

Además, la secuencia de la cadena liviana 20A12 de conejo contiene un motivo de glucosilación (NNT) en CDR3 (Figura 32A y Figura 40B), y se confirmó que este sitio está glucosilado. Se llevó a cabo una serie de variantes en la estructura quimérica conejo/humano para eliminar el sitio de glucosilación: NNT se reemplazó con QNT, QNV, SNA, SNV, ANT, GNT, NNV, o NNA (Figura 34B). Las sustituciones QNT, QNV, SNV, GNT y SNA se incorporaron en la secuencia de la cadena liviana 20A12 humanizada pulida descrita anteriormente y se ensayaron para determinar la unión a LY6G6D (Figuras 34B-34D).

20A12.QNTv12

La variante de 20A12.QNTv12 se seleccionó como el anticuerpo rb.20A12 humanizado. 20A12.QNTv12 comprende las regiones estructurales de VL de KV1-5*01; las regiones estructurales de VH de CDR HV3-23*01, modificadas con las sustituciones de aminoácidos S73, T76, V78 y P105 (derivadas de posiciones de Vernier de conejo); y las CDR de rb.20A12, con el reemplazo de los residuos de cisteína en CDR-H1 y CDR-H2 con I y A, respectivamente, y una mutación NNT con respecto a QNT en el sitio de glucosilación en CDR-L3 (Figuras 32A, 40B y 40C). K_D es 0,23 nM para rb.20A12 y 0,14 nM para 20A12.QNTv12.

Unión a LY6G6D

La variante rb.20A12 humanizada 20A12.QNTv12, la variante rb.6E10 humanizada 6E10.v114, y el brazo anti-LY6G6D 1G4 se emparejaron con el brazo anti-CD3 38E4v1 o 40G5c como TDB y se evaluaron para determinar la afinidad con respecto a LY6G6D humano y de Macaca fascicularis en un ensayo BIAcore®. 20A12 de conejo, 6E10 de conejo, y 20A12.QNTv12 y 20A12.SNVv12 humanizados se sometieron a ensayo adicional para determinar la unión como fragmentos de unión al antígeno (Fab).

LY6G6D-Fc se inmovilizó directamente en un chip, y los TDB se hicieron fluir de manera continua a 37 °C, con la excepción de Fab rb6E10, que se sometió a ensayo a 25 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Propiedades de unión de 20A12 y Fab 6E10 y variantes de TDB

5	Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
	rb20A12 Fab	4,12E+05	1,76E-04	4,26E-10
	hu20A12.QNTv12 fab	1,67E+06	2,27E-04	1,36E-10
	hu20A12.SNVv12 fab	2,18E+06	4,26E-05	1,95E-11
	hu20A12.QNTv12/38E4v1 TDB	2,20E+05	4,44E-04	2,02E-09
	hu20A12.QNTv12/40G5c TDB	8,06E+04	4,53E-04	5,62E-09
10	rb6E10 Fab (a 25 °C)	2,00E+05	6,37E-05	3,18E-10
	hu6E10.v114/38E4v1 TDB	1,98E+05	3,12E-04	1,58E-09
	hu6E10.v114/40G5c TDB	1,01E+05	2,92E-04	2,89E-09

Ensayo de producción de transfección transitoria

Se evaluaron dos variantes rb.20A12 humanizadas, 20A12.QNTv1 y 20A12.QNTv12, en un ensayo de producción de transfección transitoria. Un día después de la transfección en células de ovario de hámster chino (CHO), el medio de crecimiento se intercambió por un medio de producción de propiedad. Los sobrenadantes se recolectaron un día después de agregar el medio de producción y se evaluaron para determinar el título del anticuerpo usando ELISA de unión a Fc. El rendimiento de producción se normalizó contra 38E4v1. aFGFR1.knob se proporcionó como un control. 20A12.QNTv.1 y 20A12.QNTv12 tuvieron un rendimiento aceptable (Figura 37).

20A12.v1, 20A12.v1.pulidos (20A12.QNTv12) y 1G4 mostraron resultados favorables en un ensayo ELISA de BV (una prueba *in vitro* para determinar el riesgo de depuración atípica; Hotzel et al., *MAbs*, 4: 753-760, 2012) cuando se emparejaron con el brazo anti-CD3 38E4v1 o 40G5c (Figura 38). Los resultados se normalizaron a anti-Lye6E, un anticuerpo usado como un control para señal alta de unión en el ensayo ELISA de BV.

Los TDB LY6G6D que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4v1 o 40G5c se evaluaron para determinar las desventajas de evaluación de moléculas con el uso de tensión térmica y pruebas de tensión de oxidación con AAPH. No se identificaron desventajas (Figura 39).

La variante rb.20A12 humanizada 20A12.QNTv12, la variante rb.6E10 humanizada 6E10.v114, y el brazo anti-LY6G6D 1G4 se emparejaron con el brazo anti-CD3 38E4v1 como TDB y se evaluaron para determinar la afinidad con respecto a LY6G6D humano y de Macaca fascicularis en un ensayo BIAcore®. LY6G6D-Fc se inmovilizó

directamente en un chip, y los TDB se hicieron fluir de manera continua a 37 °C. El K_D para los TDB que comprenden el brazo 1G4 fue sustancialmente mayor que el del brazo 20A12.QNTv12 o el brazo 6E10.v114 para ambos LY6G6D humano y de *Macaca fascicularis* (Figura 36).

5 Humanización de rb.6E10

Las regiones estructurales múltiples se aplicaron para la humanización de 6E10. Las CDR de VL rb6E10 se injertaron en las secuencias de la línea germinal humana KV1-5*01 y KV3-20*01, y las CDR de VH se injertaron en las secuencias de la línea germinal humana HV3-53*01 y HV3-48*01 (Figura 43A). Estas secuencias de la línea germinal se seleccionaron a base de su alta prevalencia en suero e identidad de alta secuencia con respecto a rb.6E10 (Figuras 33A y 33B). Como se describió anteriormente para 20A12, todas las posiciones de Vernier de VL y VH de anticuerpos de conejo se injertaron en sus respectivas regiones estructurales de línea germinal humana. Los injertos con todos los aminoácidos de conejo en las posiciones de Vernier se denominan versión 1 (hu.6E10.v1a para KV1-5/HV3-53; hu.6E10.v1b para KV1-5/HV3-48; y hu.6E10.v1c para K3-20/HV3-53). Se realizaron cinco variantes de la cadena liviana adicionales para cada línea germinal (KV1-5: L2-L6 y KV3-20: L2-L6), y diez variantes de la cadena pesada (H2-H11) para HV3-53. Para la cadena liviana KV1-5, se determinó que Ala2, Phe36, y Arg43 (L3) fueron residuos clave de Vernier de conejo a base de evaluación de afinidad de unión de la variante de anticuerpos descrita anteriormente (no se muestran datos). De manera similar, para la cadena liviana KV3-20, se determinó que Ala2, Phe36 y Val58 (L4) fueron los residuos clave de Vernier de conejo. Para la cadena pesada, se descubrió que el injerto de CDR en HV3-53*01 (H11) fue suficiente para mantener la afinidad hacia huLy6G6D; no se incluyeron posiciones de Vernier de conejo. Se realizó un injerto de CDR adicional en la línea germinal HV3-48*01 (3-48H2). La cadena pesada H11 se emparejó con KV3-20.L4 como 6E10v114. La cadena pesada HV3-48.H2 se emparejó con KV1-5.L3 como 6E10v23 (Figuras 43A-43D).

Los resultados de un ensayo de evaluación de moléculas (MA) para la variante 6E10v1 se muestran en la Figura 41. Se descubrió que D(54)G y D(58)Y en CDR-H2 fueron inestables, con un incremento de 30,2 % en la isomerización durante dos semanas.

Ejemplo 3. Secuencia y estructura de cristal del anticuerpo anti-LY6G6D hu.20A12.QNTv12

Como se describe en el Ejemplo 2, el anticuerpo 20A12.QNTv12 de conejo humanizado, que tiene un epítipo superpuesto con 1G4 (Ejemplo 2), se identificó como un anticuerpo

anti-LY6G6D potente. 20A12.QNTv12 exhibió una afinidad de unión alta contra LY6G6D humano como un TDB a 37 °C (K_D de alrededor de 2nM, frente a alrededor de 16nM para 1G4), afinidad de unión comparable con respecto a LY6G6D humano y de *Macaca fascicularis*, y resultados favorables en un ensayo ELISA de BV, una prueba de expresión, y pruebas de oxidación y térmicas de evaluación de moléculas (MA). La secuencia de aminoácidos de 20A12.QNTv12, que incluye variantes modificadas para comprender pares de carga para la elaboración de una célula, y la estructura de cristal de 20A12.QNTv12 unido a LY6G6D se describen a continuación.

A. *Secuencias de aminoácidos de 20A12.QNTv12*

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena liviana de 20A12.QNTv12 se muestran en las Figuras 5A y 5B (SEQ ID NO: 22 y 23). Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena liviana de las variantes de 20A12.QNTv12 modificadas para comprender pares de carga para la elaboración de una célula se muestran en las Figuras 5C y 5D (SEQ ID NO: 10 y 11).

B. *Estructuras de cristal del anticuerpo 20A12.QNTv12 unido a LY6G6D*

Para determinar la estructura de cristal de 20A12.QNTv12 unida a LY6G6D, se cocrystalizó un polipéptido que comprende aminoácidos 93-104 de LY6G6D (SEQ ID NO: 78) con el fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 20A12.QNTv12 (Figuras 6A-6F). La estructura de cristal del complejo 20A12.QNTv12-LY6G6D se resolvió en 2,2Å, R/R_{free} 19,9/24,3 %; grupo espacial P1: 82, 138, 139, 68, 75, 90. Se evaluaron diez 20A12.QNTv12 Fab. Los residuos de LY6G6D 94-103 se resolvieron unidos a las diez copias. El polipéptido LY6G6D 94-103 formó un dímero en una estructura de cristal del anti-LY6G6D 1G4, y se unió como un monómero a 20A12.QNTv12.

C. *Estructura de cristal de 20A12.QNTv12 frente a 1G4*

Además, un polipéptido que comprende los aminoácidos 93-104 de LY6G6D (SEQ ID NO: 87) se cocrystalizó con el fragmento de región de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 20A12.QNTv12 (SEQ ID NO: 96-97) o el Fab de 1G4 (SEQ ID NO: 94 y 95). Las conformaciones de estructura del péptido fueron similares entre las estructuras de 1G4 y 20A12.QNTv12 debido a grapas de disulfuro, mientras que las cadenas laterales mostraron una movilidad conformacional significativa (Figuras 7A y 7B). Se descubrió que 20A12.QNTv12 y 1G4 se unieron a diferentes residuos del péptido LY6G6D, como se muestra en las Figuras 7C-7F y las Tablas 3 y 4. Las Figuras 7C y 7D muestran la interacción de 20A12.QNTv12 con LY6G6D. Los

residuos en 20A12.QNTv12 que interactúan con LY6G6D se etiquetaron en la Figura 7D. La Tabla 3 resume residuos de interfase en 20A12.QNTv12 Fab : Complejo LY6G6D. El epítipo de Fab 20A12.QNTv12 en LY6G6D humano consiste en residuos Arg94, Asp95, Cys96, Tyr97, Leu98, Gly99, Asp100, Leu101, Cys102 y Asn103 (RDCYLGDLCN). Cada uno de estos residuos se posiciona dentro de 5 Å del Fab. El Fab 20A12.QNTv12 utiliza los residuos de la cadena pesada Asn31, Asn32, Ala33 y Met34 de CDRH1, Ser52 de CDRH2, y Arg98, Gly99 y Asp100 de CDRH3 y los residuos de la cadena liviana Thr91, Ser92, Phe93 y Arg94 de CDRL3 para interactuar con LY6G6D.

Tabla 3. Resumen de residuos de interfase en 20A12.QNTv12 Fab : Complejo LY6G6D

Residuos de interfase en la cadena pesada de Fab 20A12.QNTv12 (SEQ ID NO: 96)	Residuos de interfase en LY6G6D (SEQ ID NO: 87)	Residuos de interfase en la cadena liviana de Fab de 20A12.QNTv12 (SEQ ID NO: 97)
Asn 31	Arg 94	Thr 91
Asn 32	Asp 95	Ser 92
Ala 33	Cys 96	Phe 93
Met 34	Tyr 97	Arg 94
Ser 52	Leu 98	
Arg 98	Gly 99	
Gly 99	Asp 100	
Asp 100	Leu 101	
	Cys 102	
	Asn 103	

Las Figuras 7E y 7F muestran la interacción de 1G4 con LY6G6D. Los residuos en 1G4 que interactúan con LY6G6D se etiquetaron en la Figura 7F. La Tabla 4 resume residuos de interfase en 1G4 Fab : Complejo LY6G6D. El epítipo de Fab 1G4 en LY6G6D humano consiste en residuos His93, Asp95, Cys96, Tyr97, Leu98, Gly99 y Asp100; cada uno de estos residuos se posiciona dentro de 5 Å del Fab. A diferencia de 20A12.QNTv12, 1G4 no interactuó con los residuos de LY6G6D Arg94, Leu101, Cys102 o Asn103. Por lo tanto, los residuos de LY6G6D Arg94, Leu101, Cys102 y Asn103 son residuos epitópicos que se unen únicamente mediante 20A12.QNTv12.

El Fab 1G4 utiliza los residuos de la cadena pesada Thr31, Tyr3 y Val33 de CDRH1 y

Arg99 y Asn100 de CDRH3 y los residuos de la cadena liviana Ser97, Tyr98, Ser99 y Ala100 de CDRL3 para interactuar con LY6G6D.

Tabla 4. Resumen de residuos de interfase en 1G4 Fab : Complejo LY6G6D

5

10

Residuos de interfase en la cadena pesada Fab de 1G4 (SEQ ID NO: 147)	Residuos de interfase en LY6G6D (SEQ ID NO: 87)	Residuos de interfase en la cadena liviana Fab de 1G4 (SEQ ID NO: 95)
Thr 31 Tyr 32 Val 33	His 93 Asp 95 Cys 96	Ser 97 Tyr 98 Ser 99
Arg 99 Asn 100	Tyr 97 Leu 98	Ala 100
	Gly 99 Asp 100	

15

Ejemplo 4. Ensayos de actividad de TBD *in vitro*

Citotoxicidad, unión celular, activación de linfocitos T e inactivación de células

20

Los TDB LY6G6D (por ejemplo, TDB LY6G6D que tienen un brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12, o una variante de este) emparejados con el brazo anti-CD3 38E4v1 o 40G5c se evaluaron para determinar la actividad *in vitro* usando células HT55 (línea de células de carcinoma de colon humano), que expresan de manera endógena un nivel medio de LY6G6D (Figuras 9A-9C, 10A-10D y 11F-11H). 40G5c y 38E4v1 son anticuerpos de hibridoma humanizados obtenidos de ratones inmunizados con péptido conjugado con KLH (hemocianina de lapa californiana) que abarca los 27 aminoácidos del terminal N de Cd3ε humano. Previamente, se observó que 40G5c tenía afinidad relativamente baja con CD3, mientras que se observó que 38E4v1 tenía alta afinidad (publicación estadounidense N.º 2015-0166661).

25

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de la sangre de donantes sanos mediante gradiente Ficoll y se usaron como células efectoras.

30

Los cocultivos de PBMC humana y células HT55 (E:T=10:1) se incubaron en presencia de diversas concentraciones del TDB LY6G6D. La inactivación de células diana y la activación de linfocitos T se midió después de 72 horas de incubación. La inactivación de células diana se cuantificó como porcentaje de citotoxicidad mediante la medición de intensidad de luminiscencia (RLU) en un ensayo CellTiter-GLO®. El porcentaje de inactivación de células diana se calculó usando la siguiente ecuación:

35

% de inactivación de células diana = {(RLU en cavidad no tratada - RLU en cavidad

tratada con TDB) / (RLU en cavidad no tratada)} x 100.

La activación de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ se midió usando separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Para los linfocitos T CD8+, se detectó la expresión superficial de CD69 y CD25, y el porcentaje de linfocitos T CD8+ que fueron CD69+CD25+ se informó como activación de linfocitos T CD8+.

El TDB LY6G6D que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4v1 fue potente en la inducción de la activación de linfocitos T (Figuras 9B, 9C, 10B, 10C, 11G y 11I) e inactivación de células diana (Figuras 9A, 10A, 10D, 11D-11F y 11H) *in vitro* contra HT55 en una manera dependiente de la dosis. Al emparejarse con el brazo anti-CD3 38E4v1 de alta afinidad, 20A12.QNTv12 tuvo una potencia de inactivación de células *in vitro* comparable con 1G4. Cuando el brazo 20A12.QNTv12 se emparejó con el brazo anti-CD3 40G5c de baja afinidad, la potencia de inactivación celular fue menor que la del brazo 38E4v1; sin embargo, el TDB que comprende los brazos 20A12.QNTv12 y 40G5c tuvo mayor potencia de inactivación celular que el TDB que comprende los brazos 1G4 y 40G5c. (Figuras 11D y 11E). 20A12 de conejo también mostró una mayor afinidad de unión a células HT55 en lugar de 1G4 (Figura 4F).

En un ensayo con PMBC de diez donantes humanos sanos, la inactivación celular promedio de EC50 mediante un TDB que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4v1 fue de alrededor de 1,04 ng/ml (7 pM); el promedio de activación de linfocitos T CD8+ EC50 fue de alrededor de 87 ng/ml (583 pM) (Figuras 11F-11H). La inactivación celular y la activación de linfocitos T CD8+ T también se evaluaron en Colo320DM (línea de células de adenocarcinoma colorrectal en estadio C de Dukes humano) y células LS1034 (línea de células de adenocarcinoma colorrectal en estadio C de Dukes humano) (Figura 11A), que expresan diferentes niveles de LY6G6D (Figuras 11B y 11I).

Ejemplo 5. Actividad de TBD *in vivo* y ensayos de depuración

A. Volumen tumoral

Los TDB LY6G6D candidatos que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 40G5c o 38E4.v1 se evaluaron para determinar la actividad *in vivo* contra tumores LS1034 y HT55 de xenoinjerto en ratones NSGTM (Figuras 16A-16C 17A-17C). Los ratones se humanizaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB y que no comprenden PMBC se proporcionaron como controles. La concentración sérica de TDB se midió usando un ensayo ELISA farmacocinético de inmunoglobulina genérico (GRIP) (Yang et al., J.

Immunol. Methods, 8-20, 2008) luego de la administración de una sola dosis del TDB.

Se estableció la eficacia *in vivo* de los TBD LY6G6D que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 40G5c o 38E4.v1 contra tumores LS1034 (puntaje de IHC de LY6G6D 3+) y los tumores HT55 (puntaje de IHC de LY6G6D 2+).

5 Para los modelos tumorales LS1034 y HT55, se observó mayor eficacia para el TDB que comprende el brazo anti-CD3 38E4.v1 de alta afinidad (1 mg/kg, dosis única, IV, D0) (Figuras 16A y 17A). La eficacia y PK fueron dependientes de la dosis para el TDB LY6G6D que comprende 38E4.v1, y se observó una pequeña diferencia en PK sérica entre el TDB LY6G6D que comprende 38E4v1 y el TDB LY6G6D que comprende 40G5c
10 (Figuras 16A-16C y 17A-17C). La eficacia *in vivo* de TDB LY6G6D que comprenden el brazoanti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 38E4.v1 también se evaluó contra los tumores Colo320DM (Figura 12).

B. Depuración en ratones SCID

La depuración de TDB LY6G6D que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12
15 un brazo anti-CD3 40G5c o 38E4.v1 se midió en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) luego de la administración intravenosa de una sola dosis de 5 mg/kg del anticuerpo usando un ensayo ELISA de GRIP (Figura 18). La tasa de depuración (7,67 ml/día/kg) fue comparable con otros TDB emparejados con el brazo anti-CD3 38E4v1. Las tasas de depuración variaron de 8,6 a 16 ml/kg/día. El TDB que
20 comprende 20A12.QNTv12 y 38E4v1 tuvo farmacocinéticas (PK) aceptables en ratones SCID y mostró una diferencia de menos de dos veces en CL sistémica en comparación con el anticuerpo anti-gD 5B6 de control. No hubo evidencia de desventajas de PK (PK atípica) para el TDB LY6G6D que comprende brazos 20A12.QNTv12 y 38E4v1 en especies de no unión. Todas las soluciones de dosis se recuperaron dentro de $\pm 20\%$
25 de la dosis nominal.

Ejemplo 6. Ensayos de seguridad en *Macaca fascicularis*

A. Estudio de toxicidad en Macaca fascicularis

Un estudio de toxicidad para un TDB LY6G6D que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 se llevó a cabo en *Macaca fascicularis*
30 (cyno). El estudio tuvo un diseño adaptativo con grupos de dosis iterativos y espaciados (Figura 19). El Grupo 2 se trató con una infusión IV de dosis única (1 mg/kg) del TDB LY6G6D el Día 1 (D1). Los Grupos 3, 4 y 5 se trataron con una infusión IV de dosis única (2, 4 y 8 mg/kg, respectivamente), y el Grupo 6 se trató con una infusión IV de dosis única (15 mg/kg). La autopsia terminal se llevó a cabo el D8 para evaluar histopatología
35 (Figura 19). Los objetivos del estudio fueron eliminar el riesgo del direccionamiento de

LY6G6D en animales sanos y evaluar rangos de dosis. Se incluyeron los criterios de valoración de PK/PD y de toxicidad estándar en función de la experiencia previa de TBD. La PK intravenosa se evaluó para todos los grupos de tratamiento con el uso de un ensayo ELISA de GRIP. Los resultados mostraron una exposición sistémica proporcional mayor que la dosis (AUC_{0-7} de dosis normalizada). La depuración (CL) disminuyó con el aumento en dosis del TBD (4 mg/kg y superior), lo que indica la saturación de la disposición farmacológica mediada por la diana (TMDD) en estas dosis (mediada por CD3, en sangre periférica) (Figura 20A; Tabla 5). PK en la dosis de 1 mg/kg fue comparable con los datos históricos de otros TBD en *Macaca fascicularis*, por ejemplo, un TBD gD/38E4v1, que mostró una CL de alrededor de 20 ml/kg/día (Figuras 20A y 20B). Las soluciones de dosis se recuperaron dentro de $\pm 20\%$ del valor nominal.

Tabla 5. PK intravenosa para *Macaca fascicularis* tratados con TBD

Dosis	Animal #	C _{max} (ug/ml)	AUC ₀₋₇ (día*ug/ml)	AUC ₀₋₇ /Dosis (día*kg*ug/ml/mg)	CL (ml/día/kg)	t _{1/2} (días)
1 mg/kg	2001	23,5	35,1	35,1	25,9	2,24
2 mg/kg	3001	45,4	83,5	41,8	20,4	2,68
4 mg/kg	4001	115	246	61,5	12,8	3,20
8 mg/kg	5001	211	452	56,5	12,3	4,27
15 mg/kg	6001	344	926	61,7	12,5	3,40
15 mg/kg	6003	364	940	62,7	10,9	4,42

El tratamiento IV de dosis única con un TBD LY6G6D que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 fue bien tolerado en dosis de hasta 15 mg/kg. Las observaciones clínicas no incluyeron tratamiento veterinario y no tuvieron efecto en mortalidad, peso corporal o consumo de alimentos. En la dosis de 15 mg/kg, se observaron vómitos (moderados) en el Animal N.º6001, y se notaron rostro pálido y temblores (leves) en el Animal N.º 6003 solo a las 4-5 horas después de la dosis. La patología clínica no mostró evidencia de inflamación o lesión hepática y elevación leve de la proteína C reactiva (CRP) (Figura 22B). La patología anatómica mostró infiltrados mononucleares perivasculares/vasculares en el cerebro de un animal en la dosis de 15 mg/kg (Animal N.º 6003, con temblores leves observados) (Figura 21). La concentración de las citocinas G-CSF, IL-1Ra, MCP-1, TNF- α , IL-13, IL-8 y proteína C reactiva (CRP) se midió luego del tratamiento (Figuras 22A y 22B). Algunas citocinas mostraron un crecimiento leve en concentración en las dosis ≥ 1 mg/kg. No hubo evidencia de relación dosis-respuesta. Se observó un aumento leve en MCP-1 a ≥ 4 mg/kg (Figura 22A). Todos los cambios volvieron al valor inicial a las 24 horas después

del tratamiento.

Los recuentos de linfocitos T colaboradores (Th) que expresan CD3+/CD4+/CD5+ CD25, linfocitos T citotóxicos (Tc) que expresan CD3+/CD8+/CD5+ CD25, linfocitos T CD45+/CD3+, linfocitos B CD45+/CD20+ y células *natural killer* CD45+/CD16+ se midieron mediante citometría de flujo (Figuras 23A-23D). Las mediciones se tomaron 7 días antes del tratamiento (Día -7) y el día del tratamiento (Día 1 Pre) y se promediaron para proporcionar un promedio predosis. Después de terminar la infusión, se tomaron mediciones a las 2 horas, 6 horas, 24 horas y 168 horas. Se observaron los picos que muestran activación de linfocitos T leve (Figura 23A), recuperación de linfocitos T (Figura 23B) y recuperación de linfocitos B (Figura 23C).

Ejemplo 7. Ensayos BIAcore de afinidad

Los TDB que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 (Figura 24A) o el brazo 40G5C (Figura 24B) se sometieron a ensayo para determinar la afinidad a un polipéptido Ly6G6D humano y de *Macaca fascicularis* usando un ensayo BIAcore. Ly6G6D-Fc se inmovilizó directamente sobre el chip, y el TDB se hizo fluir de manera continua a 37 °C. Se llevaron a cabo ensayos similares para los TDB que comprenden el brazo anti-LY6G6D 1G4 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 (Figura 24C) o el brazo 40G5C (Figura 24D). Los resultados de estos ensayos se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis de BIAcore de TDB contra LY6G6D-Fc humano y de *Macaca fascicularis*

	Ly6G6D humano				Ly6G6D de <i>Macaca fascicularis</i>			
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (M)	Rmax	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D (M)	Rmax
20A12.QNTv12/38E4v1	2,20E+05	44,4E-04	2,02E-09	60,085	1,66E+05	3,80E-04	2,29E-09	208
20A12.QNTv12/40G5c	8,06E+04	4,56E-04	5,62E-09	52,603	8,43E+04	4,13E-04	4,91E-09	171
1G4/38E4v1	5,44E+05	8,86E-03	1,63E-08	125,15	7,14E+05	9,36E-03	1,31E-08	314
1G4/40G5c	3,14E+05	9,83E-03	3,13E-08	91,745	2,93E+05	9,71E-03	3,31E-08	240

Un TDB LY6G6D elaborado con el uso de un sistema de dos células y que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 tuvo alta afinidad de unión contra polipéptidos LY6G6D humano y de *Macaca fascicularis* y el dominio extracelular (ECD) humano y de *Macaca fascicularis* de CD3 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de BIAcore de TDB contra LY6G6D-Fc y CD3 ECD humano y de

Macaca fascicularis

5

Molécula	Diana	Biacore K _D nM
20A12.QNTv12	huLY6G6D	2,02
	cyLY6G6D	2,29
	huCD3	20
	CyCD3	15

10

Los TDB que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4.v1 (panel izquierdo; producido usando un sistema de elaboración de dos células), 38E4.v1 MD1 (panel central; producido usando un sistema de elaboración de una célula), o 38E4.v1 MD4 (panel derecho; producido usando un sistema de elaboración de una célula) se sometieron a ensayo para determinar la afinidad un polipéptido Ly6G6D humano (Figura 25) usando un ensayo BIAcore. Los resultados de estos

15

Tabla 8. Análisis de BIAcore de TDB contra LY6G6D-Fc humano y de *Macaca fascicularis*

20

Muestra	Ligando	Rmax (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
20A12.QNTv12/38E4v1	hu Ly6G6D	57,9	2,99E+05	4,16E-04	1,39
	Ly6G6D de <i>Macaca fascicularis</i>	57,2	2,31E+05	4,44E-04	1,92
20A12.QNTv12.MD1/38E4v1	hu Ly6G6D	33,3	4,20E+05	7,96E-04	1,90
	Ly6G6D de <i>Macaca fascicularis</i>	34,9	1,41E+05	5,12E-04	3,63
20A12.QNTv12.MD4/38E4v1	hu Ly6G6D	56,2	2,96E+05	5,59E-04	1,89
	Ly6G6D de <i>Macaca fascicularis</i>	54,6	2,19E+05	5,74E-04	2,62

35

Ejemplo 8. Desarrollo de brazos anti-CD3 MD1 y MD4 para la elaboración de una célula

A. Sistemas de elaboración de una célula y de dos células

- 5 Los anticuerpos anti-LY6G6D (por ejemplo, 20A12.QNTv12) se elaboraron como anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T LY6G6D (TDB LY6G6D) que tienen un primer brazo con especificidad anti-LY6G6D y un segundo brazo con especificidad anti-CD3, como se muestra en la Figura 8A. Los TDB se elaboraron usando un sistema de dos células (Figura 8B) o un sistema de una célula (Figura 8C).
- 10 Para la elaboración de una célula, es importante que el primer brazo y el segundo brazo se expresen en niveles comparables en la célula huésped: Grandes diferencias en el nivel de expresión aumentan la posibilidad de errores de emparejamiento de la cadena liviana (LC) y disminuyen la posibilidad de emparejamiento correcto del TDB. El brazo anti-CD3 38E4v1 tiene relativamente poca expresión, mientras que el brazo anti-
- 15 LY6G6D 20A12.QNTv12 se expresa en mayor medida (Figura 37). En un ensayo de transfección transitoria para evaluar el ensamblaje de TDB, el TDB LY6G6D que comprende un brazo 38E4v1 y un brazo 20A12.QNTv12 no alcanzó >80 % de emparejamiento correcto incluso cuando las relaciones de ADN que codifican los brazos respectivos se modificaron a una relación de 1:16 (Figura 29D).
- 20 Dos variantes del brazo anti-CD3 38E4v1, 38E4v1 MD1 (MD1) y 38E4v1 MD4 (MD4) se desarrollaron para tener mejor expresión en comparación con 38E4v1 y permitir de este modo una mejor elaboración de TDB LY6G6D con formato de una célula (por ejemplo, un TDB LY6G6D con formato de una célula que tiene un brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12). Se descubrió que MD1 y MD4 tienen una relación favorable de
- 25 impureza biespecífica frente al error de emparejamiento de LC (es decir, alta pureza de TDB de LY6G6D formados correctamente) y potencia *in vitro*, potencia *in vivo* y PK comparables con respecto a 38E4v1 de tipo silvestre.

Los TDB elaborados con el sistema de una célula se modificaron adicionalmente para comprender mutaciones por sustitución de aminoácido que introducen pares de carga, como se muestra en la Figura 8D o 8E, y como se describe en la presente.

B. Variante de una célula de 20A12.QNTv12

- Para facilitar la elaboración en un sistema de una célula, las secuencias de la cadena pesada y la cadena liviana del brazo 20A12.QNTv12 se modificaron para comprender mutaciones por sustitución de aminoácido que introducen pares de carga (Figuras 5C,
- 35 5D y 8A-8E).

C. Generación de variantes de expresión 38E4v1 MD1 y MD4

Para crear variantes mejoradas por expresión de 38E4v1 adecuado para la elaboración en un sistema de una célula, la secuencia de VL de 38E4v1 se modificó con residuos de 40G5c, un anticuerpo anti-CD3 que tiene mejor expresión que 38E4v1, como se describe más adelante. Las dos variantes de 38E4v1 38E4v1 MD1 (MD1) y 38E4v1 MD4 (MD4) tienen una relación favorable de impureza biespecífica frente al error de emparejamiento de LC y potencia *in vitro*, potencia *in vivo* y PK comparables con respecto a 38E4v1 de tipo silvestre (WT) en ratones.

Se generaron las variantes de la región variable de la cadena liviana (VL) 38E4v1 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos derivadas de la secuencia de la cadena liviana del anticuerpo anti-CD3 40G5c de menor afinidad (Figura 29A). La VL MD1 de 38E4v1 contiene cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de 38E4v1: S43P, T51A, K55E y K89T (Figura 29A). La VL MD4 contiene solo las sustituciones S43P y T51A (Figura 29A). También se generaron las variantes que comprenden solo una sustitución de aminoácidos S43P, T51A, K55E o K89T. Todas las variantes de 38E4v1 comprendieron la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de 38E4v1 (Figura 29B).

C. Ensayo de transfección transitoria

Los niveles de expresión de 38E4v1, MD1, y las variantes que comprenden solo sustituciones de aminoácidos S43P, T51A, K55E o K89T con respecto a 38E4v1 se evaluaron en un ensayo de transfección transitoria en células huésped 11-9 de ovario de hámster chino (CHO).

Un día después de la transfección, se intercambié el medio de crecimiento para un medio de producción. Los sobrenadantes se recolectaron un día después de agregar el medio de producción y se evaluaron para determinar el título del anticuerpo usando ELISA de unión a Fc. El rendimiento de producción se normalizó contra 38E4v1. La cadena liviana de 38E4v1 parece limitar el rendimiento de la expresión del anticuerpo. De manera inesperada, el reemplazo de posiciones individuales en la cadena liviana de 38E4v1 con residuos del anticuerpo anti-CD3 40G5c de menor afinidad (S43P, T51A o K89T) generó mejoras moderadas en los rendimientos (Figura 29C), y se observó un aumento más sustancial en el rendimiento cuando estos cambios se combinaron en la variante MD1, que comprende todas las sustituciones de aminoácidos S43P, T51A, K55E, K89T (Figuras 29A y 29C).

En un ensayo de transfección transitoria para el ensamblaje de TDB, las variantes de 38E4v1 MD1 y MD4 mejoradas por expresión alcanzaron 95 % de ensamblaje de

anticuerpos intactos en una relación 1:4 de ADN de la cadena liviana (LC) del brazo (anti-LY6G6D) con respecto al ADN del brazo anti-CD3, mientras que 38E4v1 no alcanzó >80 % del emparejamiento adecuado incluso a una relación 1:16 de ADN de LC con respecto al ADN del brazo anti-CD3 (Figura 29D). Se proporciona como un control el clon xFcRH5 de desarrollo exitoso de la línea celular. MD1 y MD4 permiten de este modo la producción de un alto porcentaje de anticuerpos biespecíficos emparejados de manera adecuada.

D. Ensayo de cinética de unión

La cinética de unión de los brazos 38E4v1 MD1 y MD4 mostró afinidad a ligandos CD3 humanos y de *Macaca fascicularis* comparable con la del brazo anti-CD3 38E4v1 de alta afinidad de tipo silvestre (WT) (Tabla 9). Las variantes MD1 y MD4 retuvieron de este modo la alta afinidad de 38E4v1. Los ensayos se llevaron a cabo usando BIAcore T200: los polipéptidos 27-mero CD3 humanos y de *Macaca fascicularis* se conjugaron en biotina y se inmovilizaron en un chip SA CM5, y los TDB se hicieron fluir de manera continua a 100 µl/min a 37 °C.

Tabla 9. Análisis de BIAcore de TDB contra LY6G6D-Fc humano y CD3 de *Macaca fascicularis*

<u>Muestra</u>	<u>Ligando</u>	<u>ka (1/MS)</u>	<u>kd (1/s)</u>	<u>KD (M)</u>	<u>Rmax (RU)</u>
Dos células WT	pept HuCD3e en biotina	2,44E/ +06	4,29E/ -02	1,76E/ -08	27,8
		2,22E/ +06	4,86E/ -02	2,19E/ -08	26,8
Dos células WT	pept CyCD3e en biotina	2,60E/ +06	3,37E/ -02	1,30E/ -08	32,6
		2,21E/ +06	3,64E/ -02	1,65E/ -08	32,6
Una célula WT	pept HuCD3e en biotina	2,59E/ +06	5,16E/ -02	1,99E/ -08	29
		2,34E/ +06	4,98E/ -02	2,13E/ -08	26,2
Una célula WT	pept CyCD3e en biotina	2,60E/ +06	3,99E/ -02	1,54E/ -08	34,8
		2,65E/ +06	4,37E/ -02	1,65E/ -08	33
Una célula MD1	pept HuCD3e en biotina	1,54E/ +06	5,04E/ -02	3,28E/ -08	25,2
		1,41E/ +06	4,56E/ -02	3,24E/ -08	21,2
Una célula MD1	pept CyCD3e en biotina	1,44E/ +06	3,83E/ -02	2,66E/ -08	31,9
		1,47E/ +06	3,76E/ -02	2,56E/ -08	26,8
Una célula MD4	pept HuCD3e en biotina	2,89E/ +06	5,44E/ -02	1,88E/ -08	25,3
		2,66E/ +06	4,95E/ -02	1,86E/ -08	26,1

Una célula MD4	pept CyCD3e en biotina	3,09E/ +06	4,33E/ -02	1,40E/ -08	30,6
		2,89E/ +06	4,26E/ -02	1,47E/ -08	33,4

E. Ensayos de farmacocinética

5 Para evaluar la farmacocinética (PK) de los diversos brazos anti-CD3, los perfiles PK de 38E4v1, 40G5c, MD1, MD4 y 38E4v1.K55E se midieron en ratones SCID CB-17 luego de la administración de dosis única de cada variante. Un anticuerpo anti-gD se usó como un control. El anticuerpo anti-gD es una IgG de control de no unión que actúa sobre el epítipo D de glucoproteína del virus del herpes simple. Todos los anticuerpos se

10 evaluaron como anticuerpos anti-CD3 monoespecíficos, bivalentes que tienen un isotipo de IgG1 humana con una mutación N297G para atenuar la función efectora mediada por FcγR.

Se administró a seis grupos de ratones CB-17.SCID hembra (n = 12 por grupo; Charles River Laboratories, 251) una dosis única IV de cada anticuerpo a una dosis de 5 mg/kg.

15 Los ratones hembra se usaron según necesidad. Históricamente, no se observaron diferencias en los estudios PK que usaron ratones macho o hembra. Las muestras de sangre se recolectaron a través de la vena femoral en puntos temporales seleccionados (3 replicados para cada punto temporal) por hasta 21 días. Las concentraciones totales de anticuerpo en suero se determinaron mediante ELISA de GRIP (placa recubierta con una anti-IgG humana) con el límite de detección de 15,6 ng/ml y se usaron para las

20 evaluaciones PK. Las recuperaciones de solución de dosis fueron 111 %, 110 %, 106 %, 97,8 %, 103 % y 106 % para anti-gD, 38E4v1, 40G5c, MD1, MD4 y 38E4v1.K55E, respectivamente. Las recuperaciones de dosis estuvieron dentro de 20 %; por lo tanto, las dosis nominales se usaron para análisis adicionales.

25 Los perfiles PK se agruparon de diferentes ratones en distintos puntos temporales. Los tiempos de recolección de muestras nominal y las concentraciones reales de solución de dosis se usaron en análisis de datos. Los parámetros de análisis no compartimentales (NCA) se calcularon usando Phoenix WinNonlin® 64 con escaso muestreo y entrada de bolo IV. Se proporcionaron valores de error estándar. Los ratones se sometieron a eutanasia después de anestesiarse con isoflurano (5 % de isoflurano con 2 l/min de O₂). Todos los procedimientos se aprobaron mediante y en conformidad con las pautas y los principios establecidos por el Comité institucional de uso y cuidado animal (IACUC) de Genentech y se llevaron a cabo en una instalación acreditada por la

30 Asociación internacional para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio.

35

Las variantes de anticuerpo anti-CD3 no reaccionan de manera cruzada con CD3 de ratón; de este modo, los perfiles PK de ratón de TDB que comprenden variantes de anticuerpo anti-CD3 proporcionaron una oportunidad de comparar la tasa de eliminación PK y no específica de las variantes en ausencia de la unión diana. Se evaluaron los perfiles de concentración sérica-tiempo de las variantes de anticuerpo anti-CD3 , junto con el control anti-gD (Figura 29E). Los datos PK de cada grupo se caracterizaron mediante NCA (Tabla 10).

El grupo al que se administró anti-gD tuvo la mayor expresión en comparación con los grupos a los que se administró variantes de anticuerpo anti-CD3. El grupo al que se administró 40G5c tuvo una exposición levemente menor en base al valor AUC_{last} en comparación con el grupo al que se administró anti-gD y tuvo la mayor exposición en comparación con el resto de las variantes de anticuerpo anti-CD3. Por otro lado, 38E4v1 tuvo la menor exposición en función de su AUC_{last} en comparación con el resto de las variantes de anticuerpo anti-CD3.

Entre las tres variantes MD1, MD4 y K55E, MD1 tuvo la mayor exposición en función de su AUC_{last} , y su perfil PK fue similar al del grupo al que se administró 40G5c. El grupo al que se administró MD4 tuvo la menor exposición en función de su AUC_{last} entre las tres variantes, y su perfil PK fue similar al del grupo al que se administró 38E4v1. Además, MD1 mejoró la exposición de 38E4v1 en ~3 veces en función de AUC_{inf} en ratones. Además, los grupos a los que se administró anti-gD, 40G5c y 38E4v1.MD1 tuvieron valores V_{ss} comparables, que fueron aproximadamente 2-veces menores que los valores V_{ss} de los grupos a los que se administró 38E4v1, MD4 y K55E (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros PK de variantes de anticuerpos anti-CD3e

Grupos	n	Dosis (mg/kg)	C_{max} (µg/ml)	AUC_{last} (µg/ml* día)	AUC_{inf} (µg/ml* día)	CL (ml/día /kg)	V_{ss} (ml/kg)	$t_{1/2}$ (días)
Anti-gD	12	5	152 ± 1,30	1050 ± 25,1	2020	2,47	97,2	19
anti-CD3.38E 4v1	12	5	70,8 ± 1,64	245 ± 10,7	279	17,9	226	9,62
anti-CD3.40G 5c	12	5	155 ± 4,47	884 ± 28,5	1300	3,85	95,6	18,4
anti-CD3.38E 4v1.MD1	12	5	117 ± 2,62	726 ± 15,8	938	5,33	101	11,7

anti- CD3.38E 4v1.MD4	12	5	78,7 ± 3,55	274 ± 10,2	354	14,1	256	13
anti- CD3.38E 4v1.K55E	12	5	72,5 ± 1,26	413 ± 14,2	629	7,95	204	18

- 5 Se proporcionaron valores de error estándar en caso de corresponder. C_{max} = concentración sérica máxima observada, AUC_{last} = área por debajo de la curva de concentración sérica-tiempo desde el tiempo 0 hasta el último punto temporal medible, Día 28. AUC_{inf} = área bajo la curva de concentración sérica-tiempo desde el tiempo 0 extrapolada al infinito. CL= Depuración. V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario. $t_{1/2}$ = semivida terminal.
- Dada la baja expresión de 38E4v1 en comparación con 40G5c, se evaluó luego si se
- 10 encontraron características del brazo CD3 que pudieron haber contribuido de manera no específica a la exposición menor observada. Se calculó la carga de la región variable (Fv) del anticuerpo y la hidrofobicidad de 38E4v1 y 40G5c usando una herramienta de evaluación de depuración *in silico* (iCAT), una herramienta de cálculo a base de
- 15 secuencia que proporciona una evaluación de riesgo teórico de depuración de anticuerpo en *Macaca fascicularis* (Sharma et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 18601-6, 2014). Esta evaluación se basa en parámetros calculados de la secuencia de dominio Fv. El puntaje iCAT se evaluó para el anticuerpo anti-CD3 bivalente. La carga de Fv calculada de 38E4v1 fue +7,6, que se encuentra fuera del rango de depuración *in vivo* aceptable (el rango aceptable incluye cargas de $Fv \geq 0$ y $\leq +6,2$), mientras que la carga
- 20 de Fv calculada de 40G5c estuvo dentro del rango aceptable a +5,6. La carga de Fv calculada para MD1 fue +4,7, y para MD4 fue +7,6. MD1 tuvo por lo tanto una carga de Fv mejorada en comparación con 38E4v1 y un riesgo teórico aceptable para la depuración en *Macaca fascicularis*.
- Además, las variantes anti-CD3 se evaluaron usando ELISA de baculovirus (BV). ELISA
- 25 de BV es una herramienta *in vitro* usada para la evaluación de depuración no específica (Hotzel et al., *MAbs*, 4: 753-760, 2012). Esta evaluación se basó en la detección mediante ELISA de la unión no específica a partículas de baculovirus, y puede identificar anticuerpos con mayor riesgo de depuración rápida. El puntaje ELISA de BV para 38E4v1 fue 1,15, que estuvo fuera del rango de depuración *in vivo* aceptable previsto
- 30 (un puntaje ELISA de BV de $> 1,0$ indica alta probabilidad de depuración rápida). En contraste, el puntaje ELISA de BV fue de 0,15 para MD1 y fue de 0,72 para MD4; de este modo, ambos MD1 y MD4 estuvieron dentro del rango aceptable. Curiosamente, mientras MD4 aprobó la prueba de ELISA de BV para evaluación adicional *in vivo*, los datos PK de ratón *in vivo* demostraron que MD4 no mejoró la exposición de 38E4v1 en
- 35 comparación con MD1.

Ejemplo 9. Ensayos de actividad de TDB para anticuerpos producidos en un sistema de una célula

Los TDB LY6G6D candidatos ensamblados con un sistema de una célula (Figuras 8C-8E) y que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 38E4v1 MD1 (MD1), 38E4v1 MD4 (MD4) o 38E4v1 (WT) se evaluaron para determinar la actividad *in vitro*, la actividad *in vivo* y la afinidad con un polipéptido CD3. Un TDB ensamblado usando un sistema de dos células (Figura 8B) y que comprende el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y el brazo anti-CD3 38E4v1 se usó como un control.

A. Citotoxicidad *in vitro*, unión celular y activación de linfocitos T

Los TDB LY6G6D que se ensamblaron usando un sistema de una célula y que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 38E4v1 MD1, 38E4v1 MD4 o 38E4v1 (WT) se evaluaron para determinar la actividad *in vitro* en células HT55 enriquecidas con PBMC de un donante sano, la activación de linfocitos T CD4+, y la activación de linfocitos T CD8+ (Figuras 14A-14C y 15A-15C). La inactivación se cuantificó como porcentaje de citotoxicidad en un ensayo CELLTITER-GLO®, y los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ se midieron usando separación de células activadas por fluorescencia (FACS), como se describe en el Ejemplo 2. Todos los TDB se dosificaron a 1mg/kg. Los TDB LY6G6D que comprenden los brazos 38E4v1 variantes fueron potentes en la inducción de la activación de linfocitos T (Figuras 14B, 14C, 15B y 15C) y la inactivación de células diana (Figuras 14A y 15A) *in vitro* contra HT55. Las variantes de MD1 y MD4 retienen de este modo la alta potencia *in vitro* de 38E4v1 mientras se proporciona facilidad de elaboración mejorada en el sistema de una célula.

B. Actividad *in vivo*

Los TDB LY6G6D que comprenden el brazo anti-LY6G6D 20A12.QNTv12 y un brazo anti-CD3 38E4v1 variante ensamblados usando un sistema de una célula se evaluaron para determinar la actividad *in vivo* contra tumores de xenoinjerto HT55 en ratones NSGTM (Figuras 26A y 26B). Los ratones se humanizaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Los tratamientos que comprenden el vehículo de administración y PMBC o que comprenden el TDB y que no comprenden PMBC se proporcionaron como controles. Las variantes de una célula que comprenden el brazo anti-CD3 38E4v1 MD1 o 38E4v1 MD4 mostraron una regresión tumoral comparable con el TDB LY6G6D de dos células.

La depuración de TDB se midió en ratones con modelo tumoral HT55 y en ratones SCID luego de la administración intravenosa de una dosis única del anticuerpo usando un

ensayo ELISA de GRIP (Figuras 27 y 28). La PK de las variantes de una célula que comprende el brazo anti-CD3 38E4v1 MD1 o 38E4v1 MD4 fue comparable a la del TDB de dos células. No se identificó desventaja de PK (por ejemplo, PK atípica) para las variantes de TDB de una célula. Las soluciones de dosis se recuperaron dentro de ± 20 % del valor nominal.

C. Ensayos de afinidad a CD3

Los TDB LY6G6D candidatos ensamblados usando un sistema de una célula y que comprenden el brazo anti-CD3 38E4v1 MD1 o 38E4v1 MD4 mostraron afinidad a CD3 comparable a la de TDB ensamblados usando un sistema de una célula o un sistema de dos células y que comprenden el brazo anti-CD3 38E4v1; MD1 y MD4, como 38E4v1, son de este modo brazos anti-CD3 de alta afinidad (Tabla 11). Los ensayos se llevaron a cabo usando BIAcore T200. Los polipéptidos 27-mero CD3 humanos se conjugaron con biotina y se inmovilizaron en un chip SA CM5. Los TDB LY6G6D se hicieron fluir de manera continua a 37 °C.

Tabla 11. Análisis de BIAcore de TDB contra LY6G6D-Fc humano y CD3 de *Macaca fascicularis*

Variante	Afinidad de CD3 (K _D en nM)	
	Ser humano	<i>Macaca fascicularis</i>
Dos células WT	19,8	14,8
Una célula WT	20,6	15,9
Una célula MD1	32,6	26,1
Una célula MD4	18,7	14,4

Si bien la invención anterior se describió con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a fin de que se entienda mejor, ni las descripciones ni los ejemplos deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y literatura científica citadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une frente al miembro G6D de la familia de antígenos linfocíticos 6 (LY6G6D), en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) (VH1) que comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):
- 5 (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
(b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y
10 (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el L1 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) (VL1) que comprende las siguientes CDR:
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
(e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
15 (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (a) el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (b) el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o (c) el anticuerpo comprende un VH1 como en (a) y un VL1 como en (b).
- 20 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el VH1 comprende las siguientes regiones estructurales (FR):
- (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;
25 (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;
(c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y
(d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.
4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el VH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
- 30 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el VH1 comprende las siguientes FR:
- (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;
(b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58;
(c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; y
35 (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5, en donde el VH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el VL1 comprende las siguientes FR:
- 5 (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
(b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;
(c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y
(d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7, en donde el
10 VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 y 6, en donde el VL1 comprende las siguientes FR:
- (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
(b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;
15 (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; y
(d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6 y 9, en donde el VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.
11. Un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende un
20 dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio VH (VH1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y el L1 comprende un dominio VL (VL1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
- 25 12. Un anticuerpo aislado que se une a LY6G6D, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1), en donde el H1 comprende un dominio VH (VH1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y el L1 comprende un dominio VL (VL1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ
30 ID NO: 60.
13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo se une al polipéptido LY6G6D humano con una K_D de alrededor de 100 pM a 10 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore.
14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo se une al
35 polipéptido LY6G6D humano con una K_D de 6,0 nM o menor.

15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo se une al polipéptido LY6G6D humano con una K_D de 4 nM o menor.
16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo se une al polipéptido LY6G6D humano con una K_D de 2 nM o menor.
- 5 17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el anticuerpo es monoclonal, humano, humanizado o quimérico.
18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a LY6G6D.
19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.
- 10 20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
21. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y 20, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- 15 22. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico.
23. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
- 20 24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.
25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el anticuerpo biespecífico se une al grupo de diferenciación 3 (CD3) y comprende un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), en donde el H2 comprende un dominio VH (VH2) y el L2 comprende un dominio VL (VL2).
- 25 26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el dominio de unión a CD3 es capaz de unirse a un polipéptido CD3 humano o un polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis*.
- 30 27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3 ϵ humano o un polipéptido CD3 ϵ de *Macaca fascicularis*, respectivamente.
28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de *Macaca fascicularis* es un polipéptido CD3 γ humano o un polipéptido CD3 γ de *Macaca fascicularis*, respectivamente.
- 35

29. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en donde el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de alrededor de 1 nM a 500 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore.
30. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el dominio de unión a
5 CD3 se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 250 nM o menor.
31. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 100 nM o menor.
32. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 15 nM o menor.
- 10 33. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 10 nM o menor.
34. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el dominio de unión a CD3 se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 5 nM o menor.
35. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-34, en donde el
15 VH2 comprende las siguientes CDR:
- (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 - (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y
 - (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y
- el VL2 comprende las siguientes CDR:
- 20 (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
 - (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
 - (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.
36. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 35, en donde (a) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con
25 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; o (c) el anticuerpo comprende un VH2 como en (a) y un VL2 como en (b).
37. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 35 o 36, en donde el VH2 comprende
30 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
38. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-37, en donde el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
39. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-34, en donde el VH2 comprende las siguientes CDR:
- 35 (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

- (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y
 (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y
 el VL2 comprende las siguientes CDR:
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
 5 (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y
 (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;
40. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 39, en donde (a) el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) el VL2 comprende una secuencia
 10 de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; o (c) el anticuerpo comprende un VH2 como en (a) y un VL2 como en (b).
41. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 39 o 40, en donde el VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 15 42. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-41, en donde el VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.
43. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 36, 39 y 40, en donde el VH2 comprende las siguientes FR:
- (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
 20 (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;
 (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
 (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
44. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 36, 39 y 40, en donde el VH2 comprende las siguientes FR:
- 25 (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
 (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
 (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
 (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.
45. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 36, 39, 40 y 43,
 30 en donde el VL2 comprende las siguientes FR:
- (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
 (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;
 (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
 (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
- 35 46. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 36, 39, 40 y 44,

en donde el VL2 comprende las siguientes FR:

- (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
- (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63;
- (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
- 5 (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

47. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-46, en donde cada uno del H1 y H2 comprende además un dominio constante de la cadena pesada (CH1) y cada uno del L1 y L2 comprende además un dominio constante de la cadena liviana (CL).

- 10 48. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU).

49. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 47 o 48, en donde el CH1 de H1 comprende una mutación S183K y el CL de L1 comprende una mutación V133E.

- 15 50. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el CH1 de H2 comprende una mutación S183E y el CL de L2 comprende una mutación V133K.

51. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 47 o 48, en donde el CH1 de H1 comprende una mutación S183E y el CL de L1 comprende una mutación V133K.

- 20 52. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 51, en donde el CH1 de H2 comprende una mutación S183K y el CL de L2 comprende una mutación V133E.

53. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende: un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), en donde cada H1 y H2 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio constante de la cadena pesada (CH1), y cada L1 y L2 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL), en donde:

(a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR:

- 30 (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
- (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
- 35 (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

- (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR:
- (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 - (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 - (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
 - 5 (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
 - (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
 - (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU),
- 10 y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y
- (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende
- 15 una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).
54. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende: un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido
- 20 de la cadena liviana (L2), en donde cada H1 y H2 comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio constante de la cadena pesada (CH1), y cada L1 y L2 comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL), en donde:
- (a) el dominio de unión a LY6G6D comprende las siguientes seis CDR:
- 25 (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
 - (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
 - (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
 - (iv) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 - (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
 - 30 (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- (b) el dominio de unión a CD3 comprende las siguientes seis CDR:
- (i) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 - (ii) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 - (iii) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
 - 35 (iv) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

- (v) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y
- (vi) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;
- (c) el CH1 de H1 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU),
- 5 y/o el CH1 de H2 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU); y
- (d) el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q38, y/o el VH de H2 comprende una sustitución de aminoácido en la posición Q39 y el VL de L2 comprende
- 10 una sustitución de aminoácido en la posición Q38 (todo según numeración de Kabat).
55. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 53 o 54, en donde el VH de H1 comprende una sustitución de aminoácido en Q39 (numeración de Kabat) y el VL de L1 comprende una sustitución de aminoácido en Q38 (numeración de Kabat).
56. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el CH1 de H2
- 15 comprende una sustitución de aminoácido en S183 (numeración EU) y el CL de L2 comprende una sustitución de aminoácido en V133 (numeración EU).
57. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 56, en donde el VH de H2 comprende además una sustitución de aminoácido en la posición Q39 (numeración de Kabat) y el VL de L2 comprende además una sustitución de aminoácido en la posición Q38
- 20 (numeración de Kabat).
58. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el CH1 de H1 comprende una mutación S183K (numeración EU) y el CL de L1 comprende una mutación V133E (numeración EU), y el CH1 de H2 comprende una mutación S183E (numeración EU) y el CL de L2 comprende una mutación V133K (numeración EU).
- 25 59. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el VH de H1 comprende una mutación Q39E (numeración de Kabat), el VL de L1 comprende una mutación Q38K, el VH de H2 comprende una mutación Q39K, y el VL de L2 comprende una mutación Q38E (numeración de Kabat).
60. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el CH1 de H1
- 30 comprende una mutación S183E (numeración EU) y el CL de L1 comprende una mutación V133K (numeración EU), y el CH1 de H2 comprende una mutación S183K (numeración EU) y el CL de L2 comprende una mutación V133E (numeración EU).
61. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el VH de H1 comprende una mutación Q39K (numeración de Kabat), el VL de L1 comprende una mutación Q38E
- 35 (numeración de Kabat), el VH de H2 comprende una mutación Q39E (numeración de

Kabat), y el VL de L2 comprende una mutación Q38K (numeración de Kabat).

62. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53 y 55-61, en donde el dominio VH de H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o el VL de L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

5 63. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 62, en donde el VH de H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el VL de L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

64. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 54-61, en donde el dominio VH de H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y/o el
10 VL de L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.

65. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 64, en donde el VH de H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el VL de L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

66. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-65, en donde
15 cada uno de un primer dominio CH3 (CH3₁) de una región Fc del H1 y un segundo dominio CH3 (CH3₂) de una región Fc del H2 comprende una protuberancia o una cavidad, y en donde la protuberancia o cavidad en el CH3₁ se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el CH3₂.

67. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde el CH3₁ y el CH3₂ se
20 encuentran en una interfase entre la protuberancia y la cavidad.

68. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66 o 67, en donde el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia y el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad.

69. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66-68, en donde (a)
25 el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366S, L368A o Y407V (numeración EU), o una combinación de estas; o (c) tanto (a) como (b).

30 70. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 69, en donde (a) el CH3₁ de la región Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); (b) el CH3₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b).

35 71. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 70, en donde (a) el CH3₁ de la región

Fc del H1 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU) y (b) el CH₃₂ de la región Fc del H2 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU).

- 5 72. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66 o 67, en donde el CH₃₁ de la región Fc del H1 comprende una cavidad y el CH₃₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia.
73. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66, 67 o 72, en donde (a) el CH₃₁ de la región Fc del H1 comprende una cavidad que comprende una
10 mutación por sustitución de aminoácido T366S, L368A o Y407V (numeración EU), o una combinación de estas; (b) el CH₃₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b).
74. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 73, en donde (a) el CH₃₁ de la región
15 Fc del H1 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU); (b) el CH₃₂ de la región Fc del H2 comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU); o (c) tanto (a) como (b).
75. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 74, en donde (a) el CH₃₁ de la región
20 Fc del H1 comprende una cavidad que comprende las mutaciones por sustitución de aminoácidos T366S, L368A e Y407V (numeración EU) y (b) el CH₃₂ de la región Fc del segundo polipéptido de la cadena pesada comprende una protuberancia que comprende una mutación por sustitución de aminoácido T366W (numeración EU).
76. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66-75, en donde las
25 regiones Fc son regiones Fc del isotipo de IgG humana, o variantes de la región Fc de estas.
77. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 76, en donde las regiones Fc son variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana.
78. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 77, en donde cada una de las
30 variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprenden una mutación en el residuo de aminoácido N297 (numeración EU) que produce la ausencia de glucosilación.
79. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 78, en donde la mutación en el residuo de aminoácido N297 es una mutación por sustitución.
80. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 78 o 79, en donde la mutación en el
35 residuo de aminoácido N297 reduce la función efectora de la región Fc.

81. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 79 u 80, en donde la mutación por sustitución es una mutación N297G o N297A.
82. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 81, en donde cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende la mutación N297G.
- 5 83. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 77-82, en donde cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende una mutación que reduce la función efectora de la región Fc.
84. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 83, en donde la mutación que reduce la función efectora de la región Fc es una mutación por sustitución.
- 10 85. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 84, en donde la mutación por sustitución es un residuo de aminoácido E233, L234, L235, D265 y/o P329 (numeración EU).
86. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 85, en donde la mutación por sustitución es una mutación E233P, L234A, L234V, L235A, D265A o P329G.
- 15 87. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 86, en donde cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende la mutación P329G.
88. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82-87, en donde cada una de las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana comprende las mutaciones N297G y P329G.
- 20 89. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82-88, en donde las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además la mutación L234A o L235A.
90. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 89, en donde las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además las mutaciones L234A y L235A.
- 25 91. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82-88, en donde las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 o IgG3 humana, en donde cada una comprende además las siguientes mutaciones por sustitución E233P, L234V y L235A (numeración EU) y una eliminación del residuo G236 (numeración EU).
- 30 92. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 91, en donde las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del isotipo de IgG1 humana.
93. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 82-88, en donde las variantes de la región Fc del isotipo de IgG humana son variantes de la región Fc del
- 35

isotipo de IgG4 humana, en donde cada una comprende además las siguientes mutaciones por sustitución E233P, F234V y L235A (numeración EU) y una eliminación del residuo G236 (numeración EU).

5 94. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 89-93, en donde las regiones Fc del complejo Fc son regiones sin efector.

95. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66-94, en donde el H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

10 96. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 95, en donde el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

97. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 95, en donde el H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

15 98. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- 20 (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
(b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
(c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y
(d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

25 99. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- 30 (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;
(b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
(c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y
(d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

35 100. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de

unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- 5 (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y
- (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

101. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de
10 unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;
- (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
- (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y
- 15 (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

102. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de
20 unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y
- (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

25 103. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- 30 (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;
- (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
- (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; y
- (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

104. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo
35 biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido

de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- 5 (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; y
- (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

105. Un anticuerpo biespecífico que se une a LY6G6D y CD3, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a LY6G6D que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H1) y un polipéptido de la cadena liviana (L1) y un dominio de unión a CD3 que comprende un polipéptido de la cadena pesada (H2) y un polipéptido de la cadena liviana (L2), y en donde:

- (a) H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;
- (b) L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
- 15 (c) H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; y
- (d) L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

106. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-105, en donde el anticuerpo tiene una depuración posterior a una inyección intravenosa de alrededor de 10 ml/kg/día a alrededor de 35 ml/kg/día.

20 107. Uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106, o una porción de este que comprende un dominio de unión que se une a LY6G6D.

108. Uno o más vectores que comprenden el uno o más ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la reivindicación 107.

25 109. Una o más células huésped que comprenden el uno o más vectores de acuerdo con la reivindicación 108.

110. La una o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 109, en donde la una o más células huésped son una o más células huésped de mamífero.

30 111. La una o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 110, en donde la una o más células huésped de mamífero son una o más células huésped de ovario de hámster chino (CHO).

112. La una o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 109, en donde la una o más células huésped son una o más células huésped procariotas.

35 113. La una o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 112, en donde la una o más células huésped procariotas son una o más células huésped de *E. coli*.

114. Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106, en donde el método comprende cultivar la una o más células huésped de acuerdo con la reivindicación 109 en un medio de cultivo.
115. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde el método comprende
5 además recuperar el anticuerpo anti-LY6G6D de la una o más células huésped o del medio de cultivo.
116. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106.
117. La composición de acuerdo con la reivindicación 116, que comprende además un
10 excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables.
118. La composición de acuerdo con la reivindicación 117, en donde el excipiente farmacéuticamente aceptable es un amortiguador, portador, estabilizante o conservante.
119. La composición de acuerdo con la reivindicación 118, en donde la composición es
15 una composición farmacéutica.
120. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106 para usar como un medicamento.
121. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 116-119 para usar en el
20 tratamiento o el retraso de la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto que lo necesita.
122. El anticuerpo o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 121, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal.
123. El anticuerpo o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 122,
25 en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) de microsatélite estable (MSS) o inestabilidad de microsatélites baja (MSI-L).
124. El uso del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106 y 120 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 116-119 en la
30 elaboración de un medicamento para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto.
125. El uso de acuerdo con la reivindicación 124, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal.
126. El uso de acuerdo con la reivindicación 125, en donde el tipo de cáncer que expresa
35 LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L.

127. Un método para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 116-119.
- 5 128. El método de acuerdo con la reivindicación 127, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal.
129. El método de acuerdo con la reivindicación 128, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L.
- 10 130. Un kit que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-106 y un prospecto del envase que comprende instrucciones para usar el anticuerpo para tratar o retrasar la progresión de un tipo de cáncer que expresa LY6G6D en un sujeto.
131. El kit de acuerdo con la reivindicación 130, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D es un cáncer colorrectal.
- 15 132. El kit de acuerdo con la reivindicación 131, en donde el tipo de cáncer que expresa LY6G6D tiene un estado de MSI de MSS o MSI-L.
133. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 130-132, en donde el sujeto es un ser humano.
134. Un anticuerpo aislado que se une a CD3, en donde el anticuerpo comprende un
- 20 dominio de unión que comprende las siguientes CDR:
- (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- 25 (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
- (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.
135. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 134, en donde el anticuerpo comprende (a) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 30 (b) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; o (c) un VH como en (a) y un VL como en (b).
136. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 134 o 135, en donde el VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 35 137. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-136, en donde

el VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

138. Un anticuerpo aislado que se une a CD3, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión que comprende las siguientes CDR:

- (a) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- 5 (b) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- (c) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- (d) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- (e) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; y
- (f) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

- 10 139. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el anticuerpo comprende (a) un VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (b) un VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; o (c) un VH como en (a)
- 15 y un VL como en (b).

140. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 138 o 139, en donde el VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

141. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 138-140, en donde el VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55.

- 20 142. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134, 135, 138 y 139, en donde el VH comprende las siguientes FR:

- (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
- (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43;
- (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
- 25 (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

143. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134, 135, 138 y 139, en donde el VH comprende las siguientes FR:

- (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;
- (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
- 30 (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; y
- (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

144. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134, 135, 138, 139 y 142, en donde el VL comprende las siguientes FR:

- a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
- 35 (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47;

- (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
 (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
145. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134, 135, 138, 139 y 143, en donde el VL comprende las siguientes FR:
- 5 (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46;
 - (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63;
 - (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
 - (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.
146. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-145, en donde
 10 el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de alrededor de 1 nM a 500 nM a 37 °C según se midió mediante un ensayo BIAcore.
147. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 146, en donde el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 250 nM o menor.
148. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 147, en donde el anticuerpo se une
 15 al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 100 nM o menor.
149. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 148, en donde el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 15 nM o menor.
150. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 149, en donde el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 10 nM o menor.
- 20 151. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el anticuerpo se une al polipéptido CD3 ϵ humano con una K_D de 5 nM o menor.
152. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-151, en donde el anticuerpo es monoclonal, humano, humanizado o quimérico.
153. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-152, en donde
 25 el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a CD3.
154. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 153, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.
155. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-152, en donde
 30 el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
156. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-155, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
157. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-156, en donde el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoespecífico.
- 35 158. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de

las reivindicaciones 134-157, o una porción de este que comprende un dominio de unión que se une a CD3.

159. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 158.

5 160. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 159.

161. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 160, en donde la célula huésped es una célula huésped de mamífero.

162. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 161, en donde la célula huésped de mamífero es una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO).

10 163. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 160, en donde la célula huésped es una célula huésped procariota.

164. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 163, en donde la célula huésped procariota es una célula huésped de *E. coli*.

15 165. Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 134-157, en donde el método comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 160 en un medio de cultivo.

166. El método de acuerdo con la reivindicación 165, en donde el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-LY6G6D de la célula huésped o del medio de cultivo.

20

25

30

35

ANTICUERPOS ANTI-LY6G6D Y MÉTODOS DE USO

RESUMEN

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-Ly6G6D (complejo 6 del antígeno linfocítico, locus G61) y métodos para el uso de estos.

5

10

15

20

25

30

35

Figura 1A

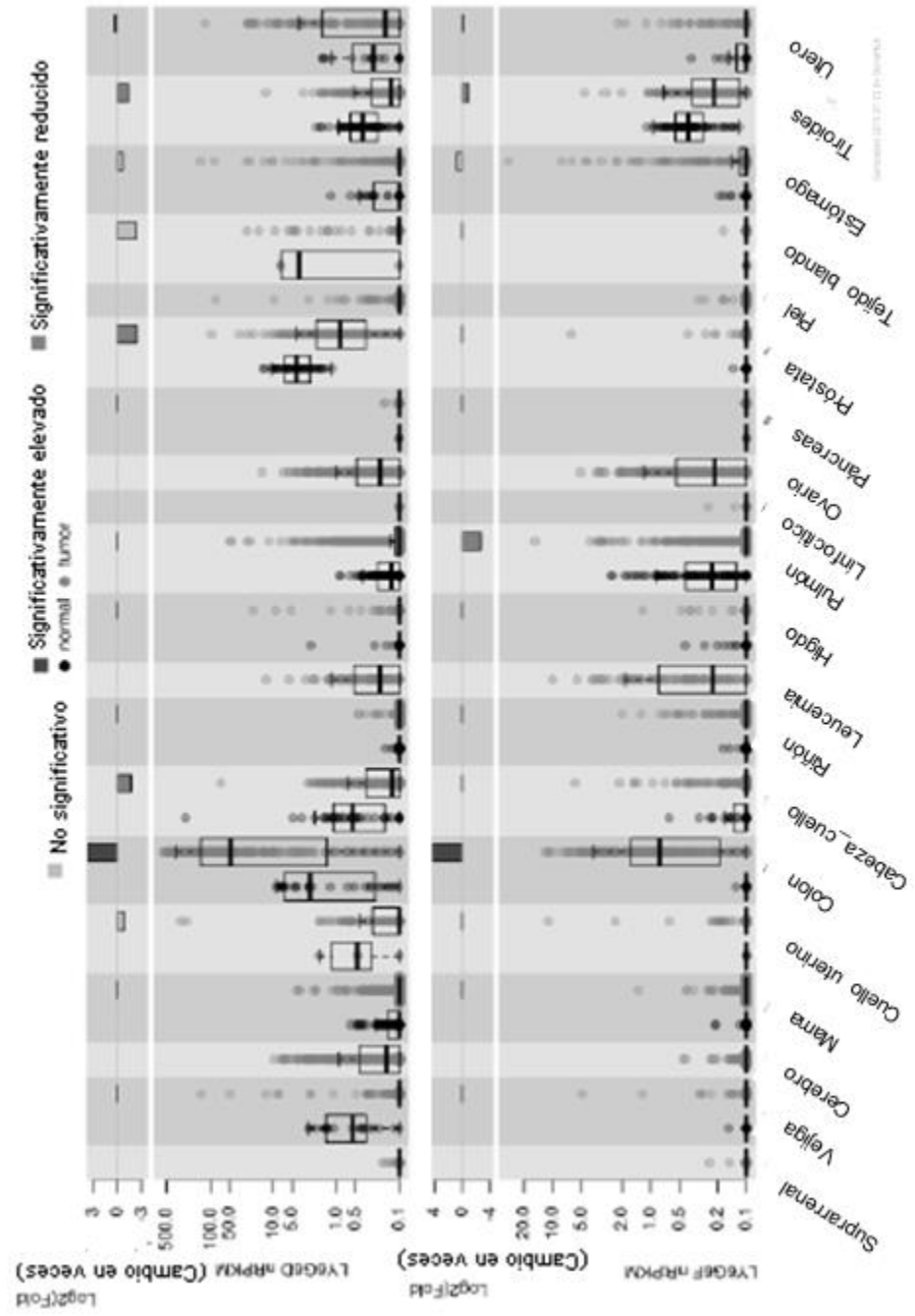


Figura 1B

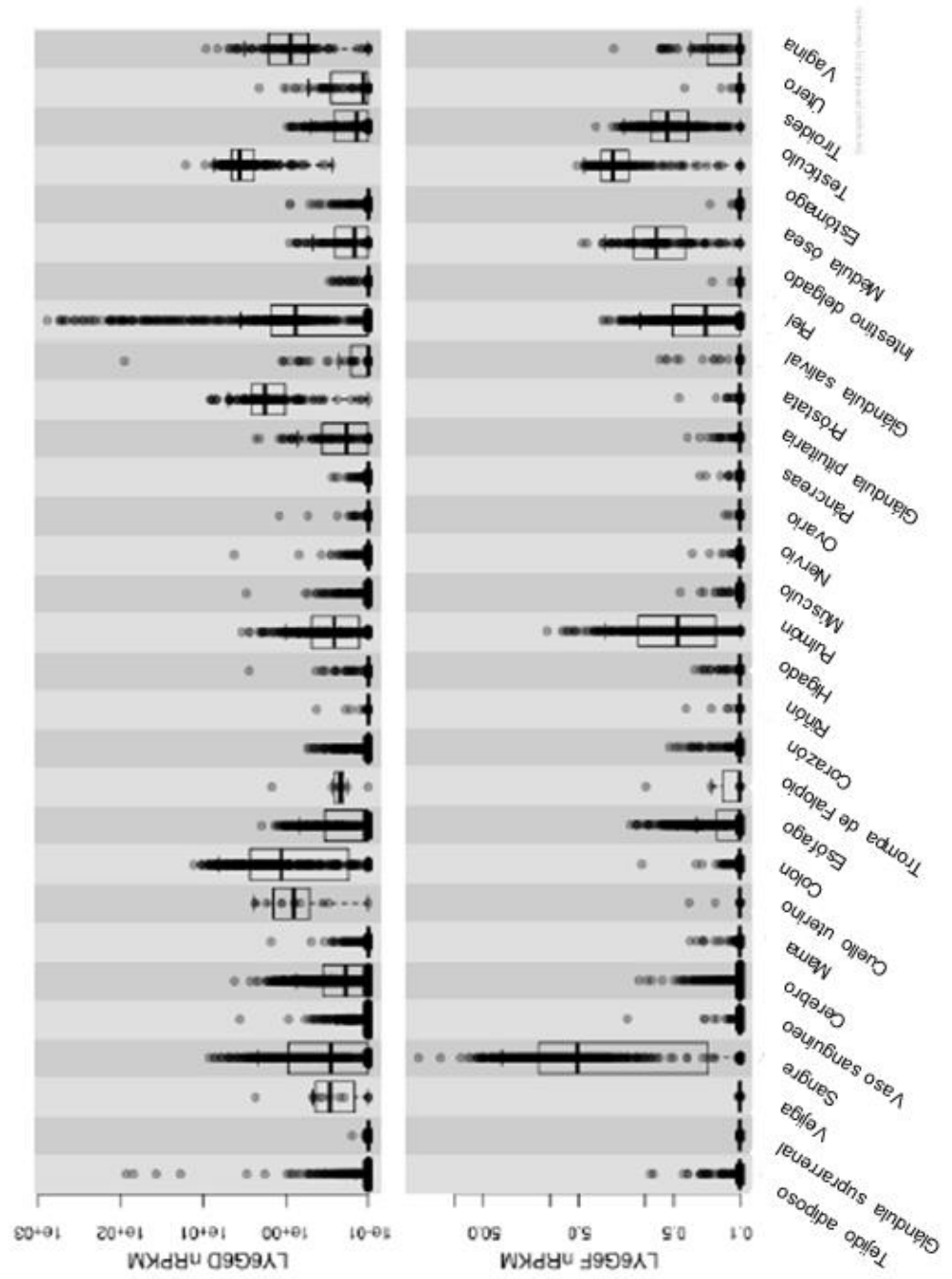


Figura 1C

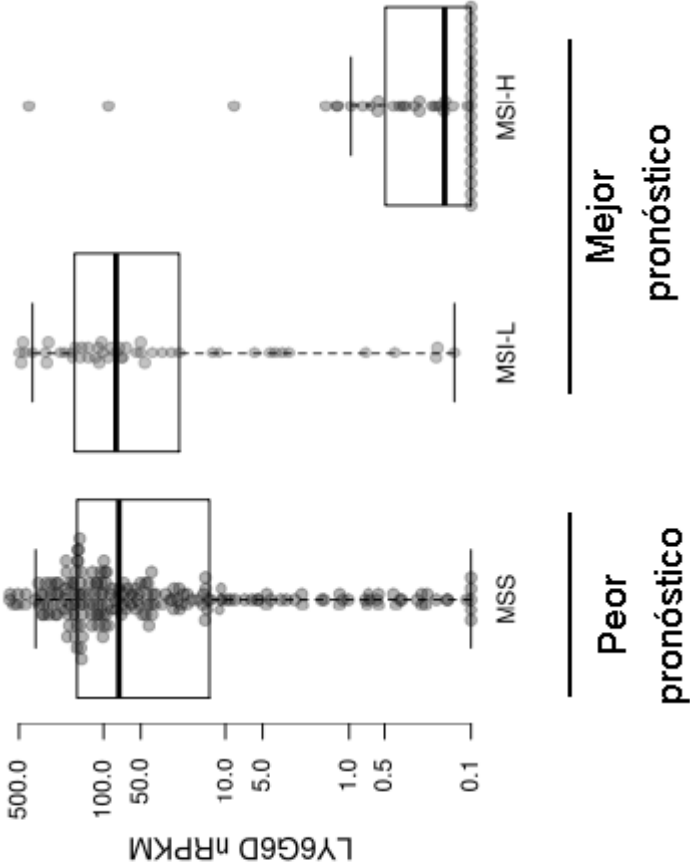


Figura 2A

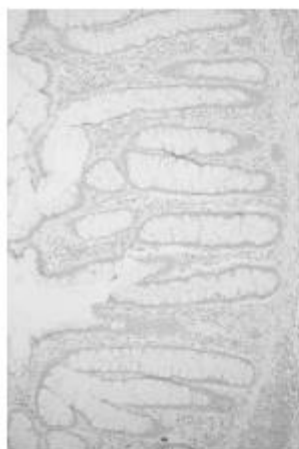
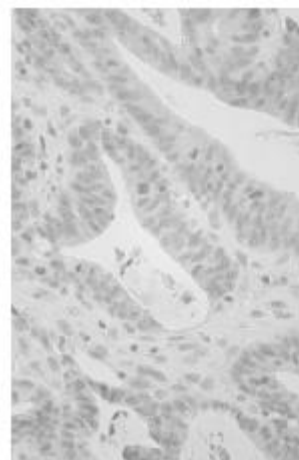
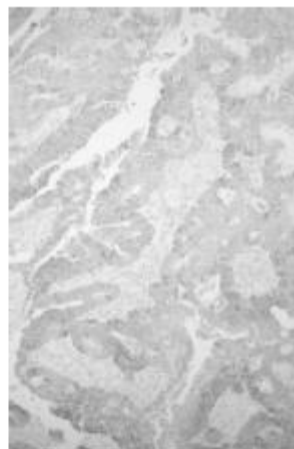


Figura 2B



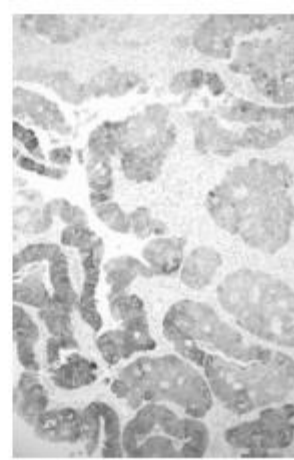
1+

Figura 2C



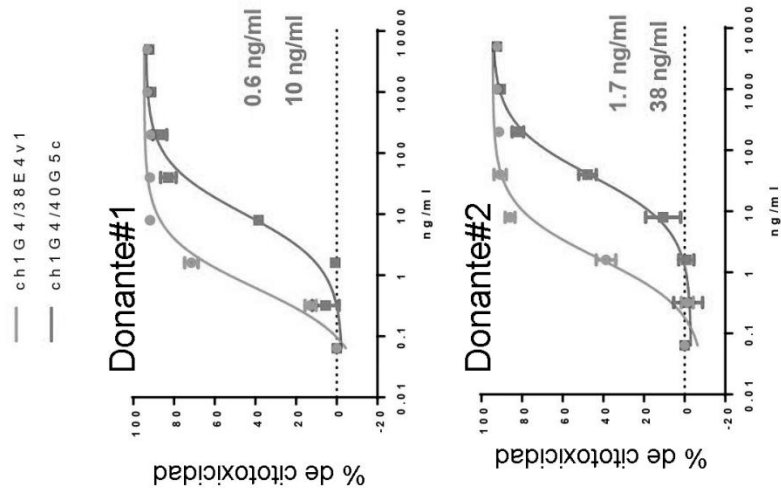
2+

Figura 2D



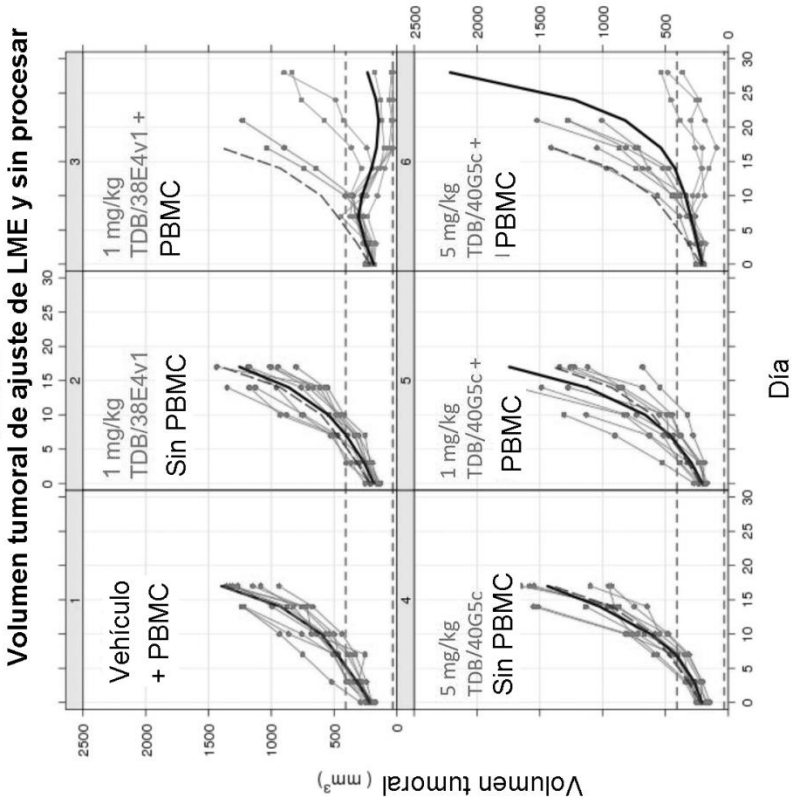
3+

Figura 3A



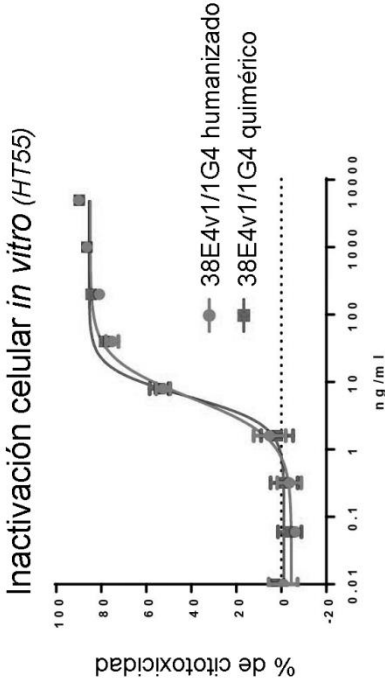
Valores de EC50 enumerados
Células HT55 con PBMC humanas 10X, ensayo de 72 horas

Figura 3B



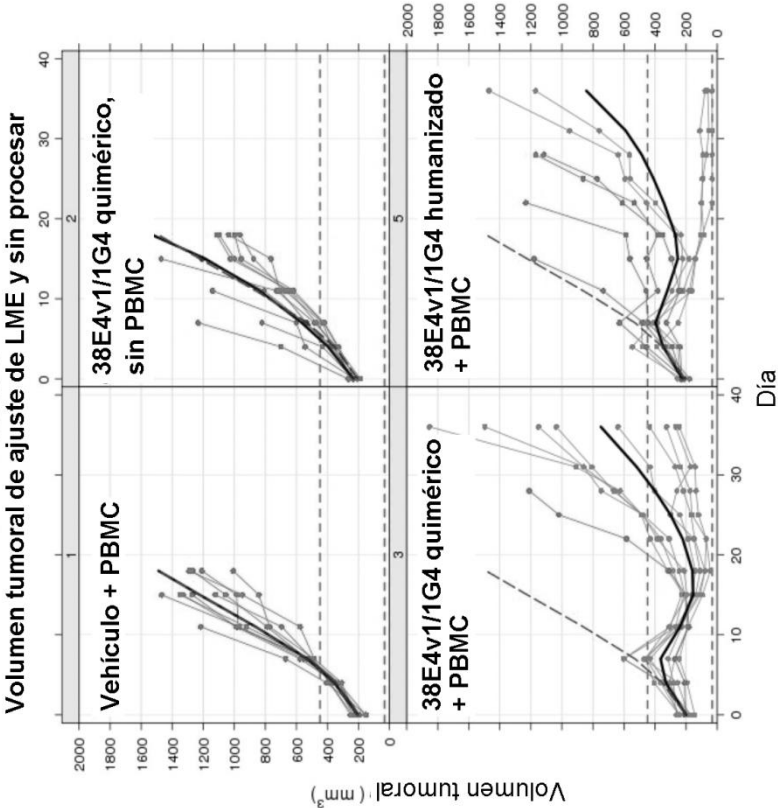
IV de dosis única; HT55 en ratones NSG con PBMC humanas

Figura 3C



Clon	KD (nM) / Biacore
1G4 humanizado	1.5
1G4 quimérico	2.7

Figura 3D



IV de dosis única; HT55 en ratones NSG con PBMC humanas

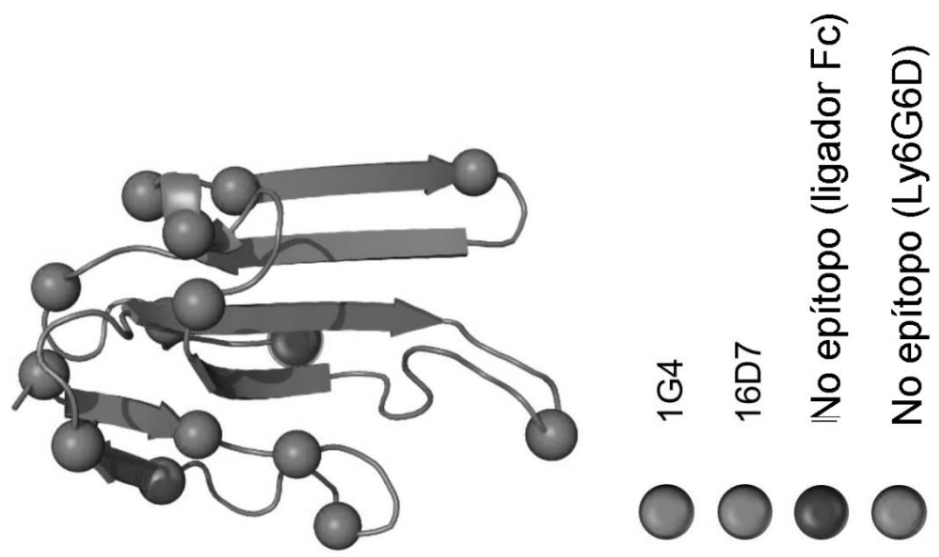
Figura 4A

Figura 4B

	WT	M22S	G28S	G28N	S32N	A38N	G43N. G45S	P60A. P61S	A73N. H75S	V80S	V80N	T82N	D87N	G99N. L101S	A105S	S108N
% glucosilado	0	1.72	11.5	0	8.17	41.2	7.32	98	94.5	91.6	97.9	5.98	99.8	24	30.1	85.9
3A4								W								
3H9								X								
7F2.C35a-HC								X								
11A11.C59-HC								X								
20F12.C35a-HC								X								
1D1								X								
chim16D7									X							
5D3									X							
5E4									X							
16D7.6									X							
3D3										X		X				
17F11										W	X	X				
2-6C9										w	w	X	X			
1F12												X	X			
14B6													X			
hu1G4 (prep 1)														X		
hu1G4 (prep 2)														X		
chim1G4														X		
4H7														X		
6E10																
20A12																
1C10														W		
1G11 (afinidad ~1G4)														X		
1F9 (=1G4)														X		
1A1														X		
16F7														X		
3E5 (*4F11)																
1D12																
1F1																
14E12																
9D6																
16G2																
10F7																

X= no se detectó unión W= la unión se redujo significativamente

Figura 4F

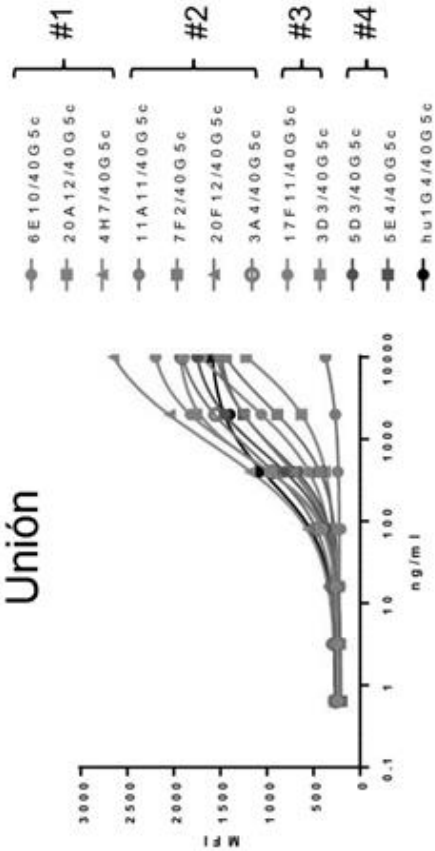


Figura 4G

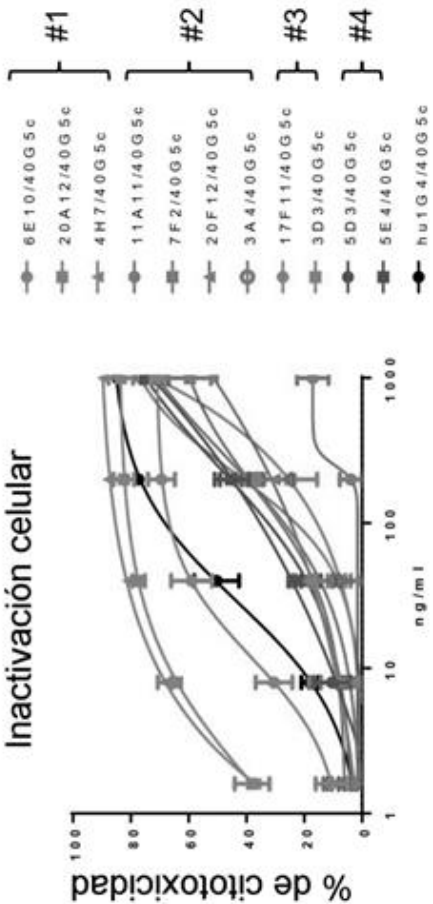


Figura 4H

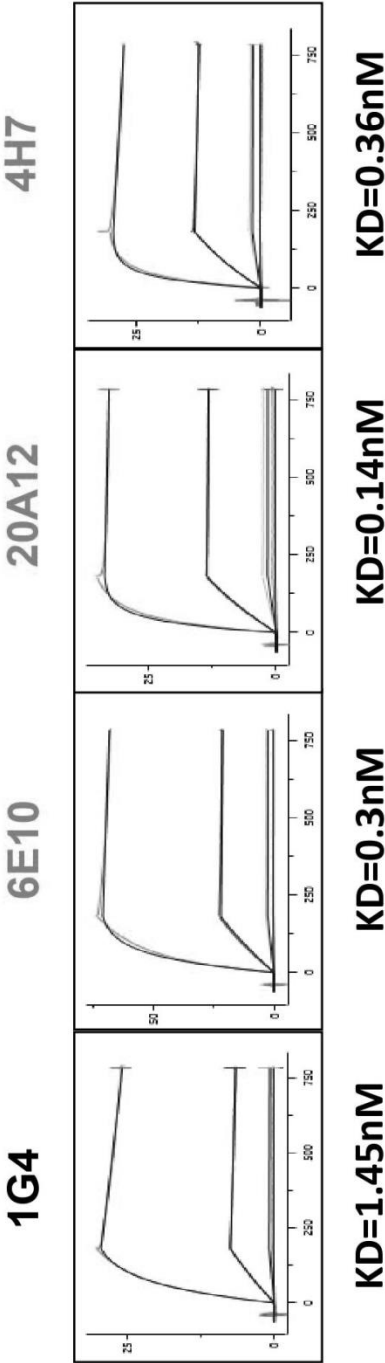


Figura 5A

Región variable de la cadena pesada

		CDR H1 - Contact			
		CDR H1 - Chothia			
		CDR H1 - Kabat			
Número de Kabat					
.20A12.QNTv12	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F D F V N N A M I W V R Q A P G				42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
		CDR H2 - Contact			
		CDR H2 - Chothia			
		CDR H2 - Kabat			
Número de Kabat					
.20A12.QNTv12	K G L E W V S A L S F A D N T A Y Y A T W A S G R F T I S R D S S K T T V Y L Q M N				82g 82 81 80 79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52g 51 50 49 48 47 46 45 44 43 42 41
		CDR H3			
		CDR H3			
Número de Kabat					
.20A12.QNTv12	S L R A E D T A V Y Y C M R G D L W G P G T L V T V S S				111 112 111 110 109 108 107 106 105 104 103 102 101 100 99 98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88 87 86 85 84 83 82 81 80 79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52 51 50 49 48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

SEQ ID NO: 22

Figura 5B

Región variable de la cadena liviana

Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL1 - Contact																					
																					CDRL1 - Chothia																					
Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL1 - Kabat																					
	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	40	41	42
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	Q	A	S	E	S	I	T	R	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL2 - Contact																					
																					CDRL2 - Chothia																					
Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL2 - Kabat																					
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	K	L	P	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	A
Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL3 - Contact																					
																					CDRL3 - Chothia																					
Número de Kabat .20A12.QNTv12																					CDRL3 - Kabat																					
	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																			
	T	Y	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	Y	Q	N	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K																
SEQ ID NO: 23																																										

SEQ ID NO: 23

Figura 5C

Región variable de la cadena pesada

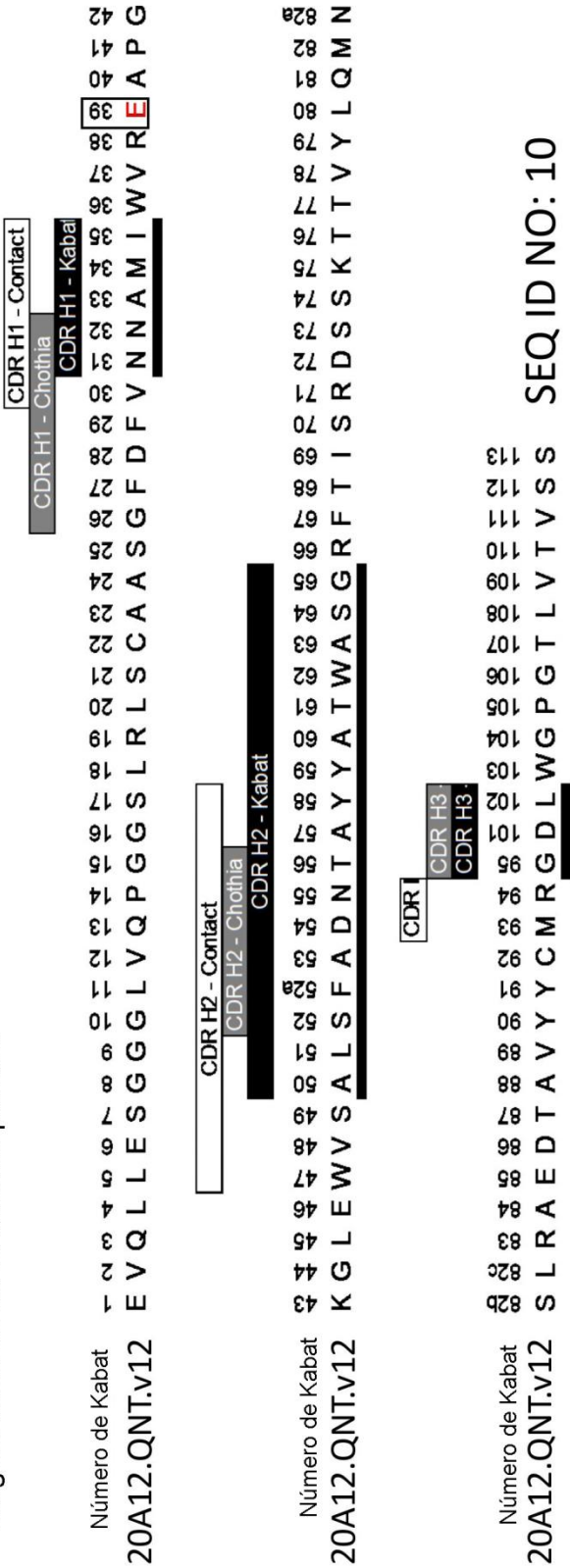


Figura 5D

Región variable de la cadena liviana

Número de Kabat	CDR L1 - Contact																			
	CDR L1 - Chothia										CDR L1 - Kabat									
20A12.QNT.v12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	T	C	Q	A	S	E	S	I	T	R	Y	L	N	W	Y	Q	K	P	G	K
	41	42																		
Número de Kabat	CDR L2 - Contact																			
	CDR L2 - Chothia										CDR L2 - Kabat									
20A12.QNT.v12	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	K	L	P	S	G	V	P	S	R	F
	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D
	83	84																		
Número de Kabat	CDR L3 - Contact																			
	CDR L3 - Chothia										CDR L3 - Kabat									
20A12.QNT.v12	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
	T	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	Y	Q	N	T	F	G	G	T
	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120				
	K	E	I	K																

SEQ ID NO: 11

Figura 6A

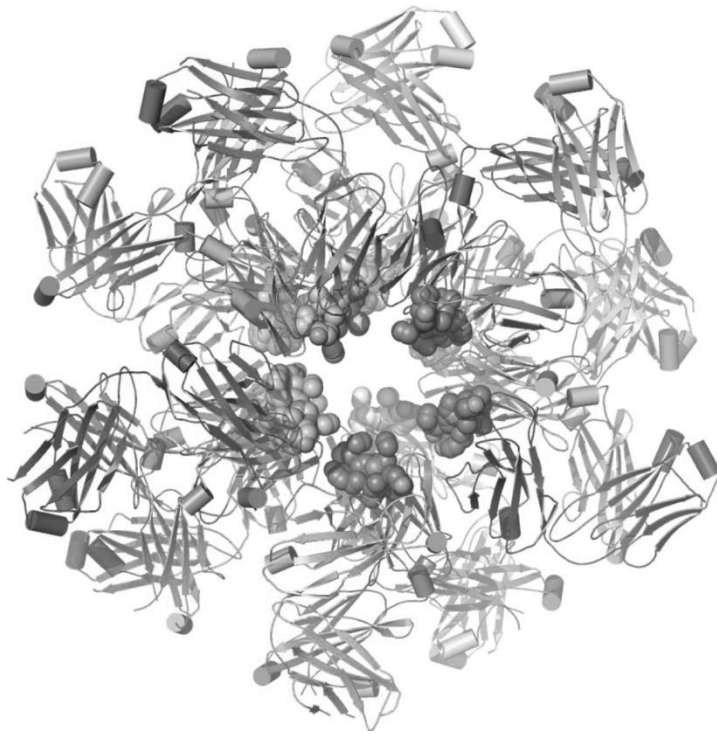


Figura 6B

10 complejos superpuestos

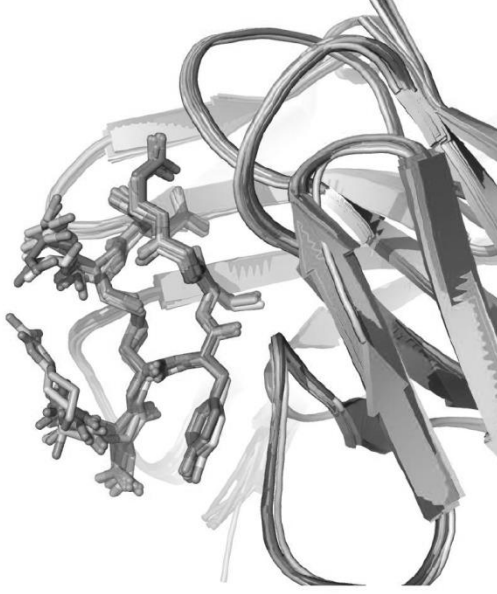


Figura 6C

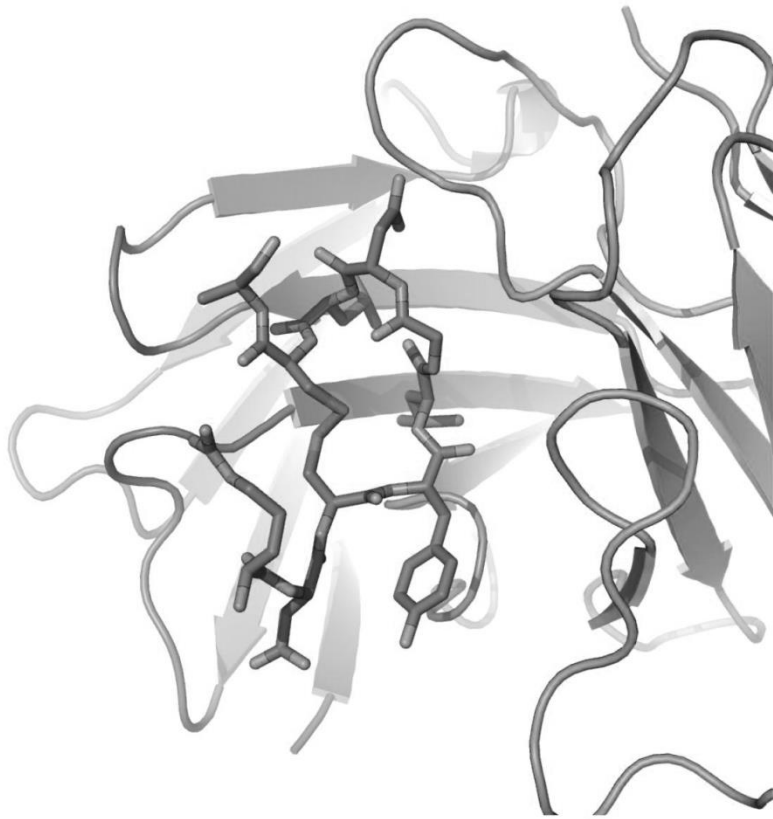


Figura 6D

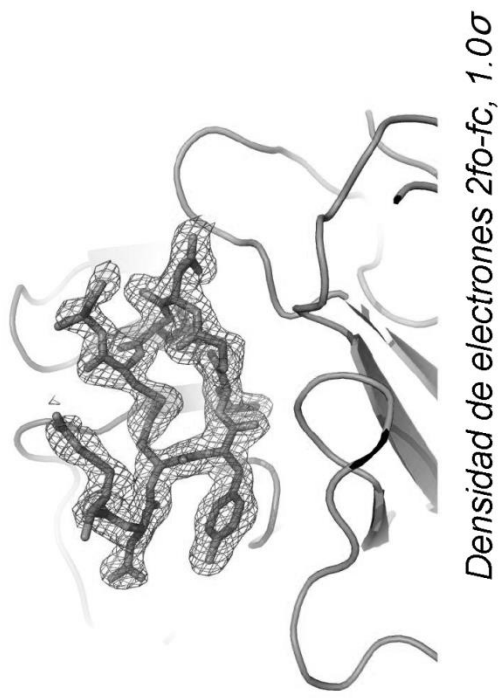


Figura 6F

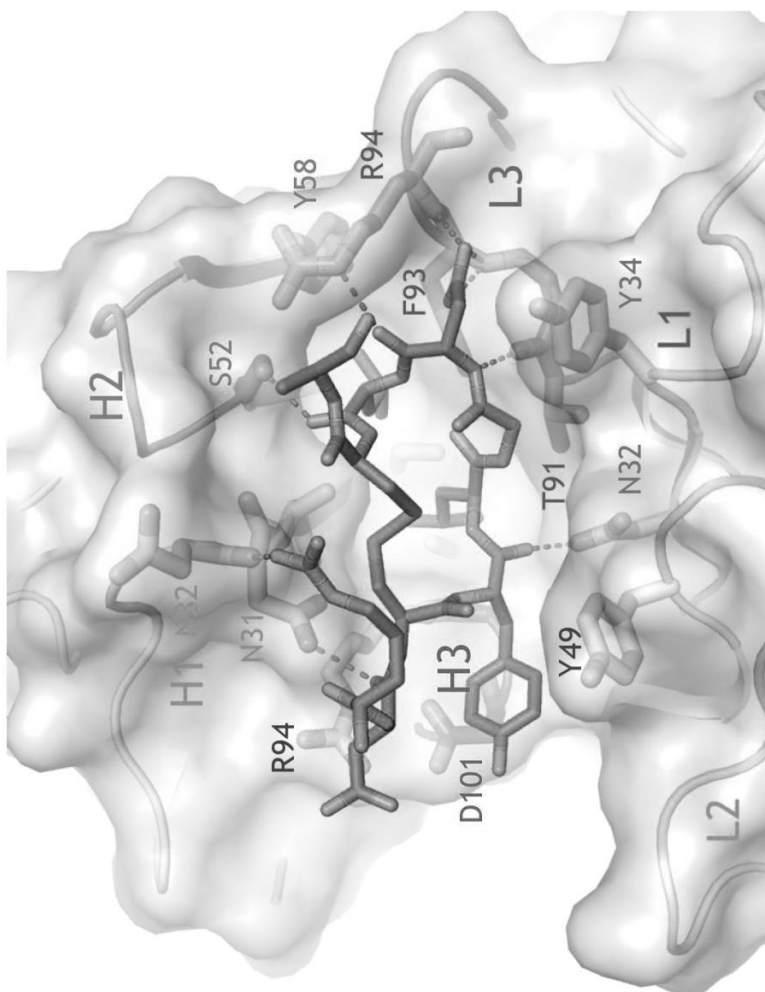


Figura 6E

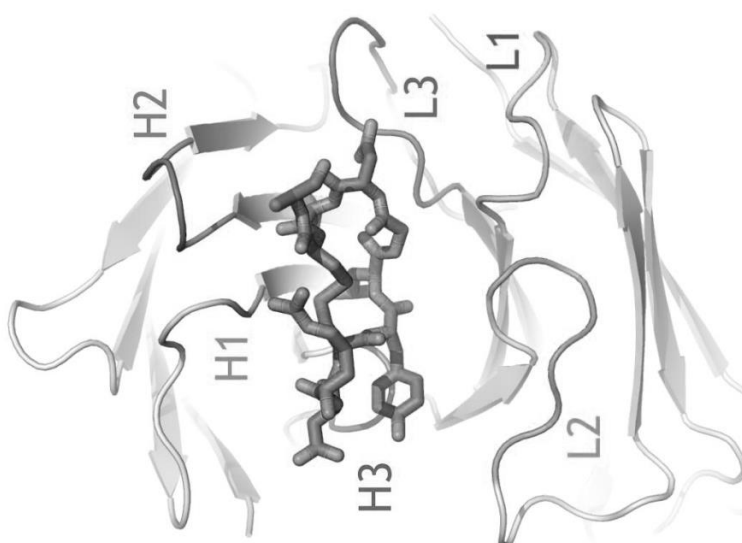


Figura 7A

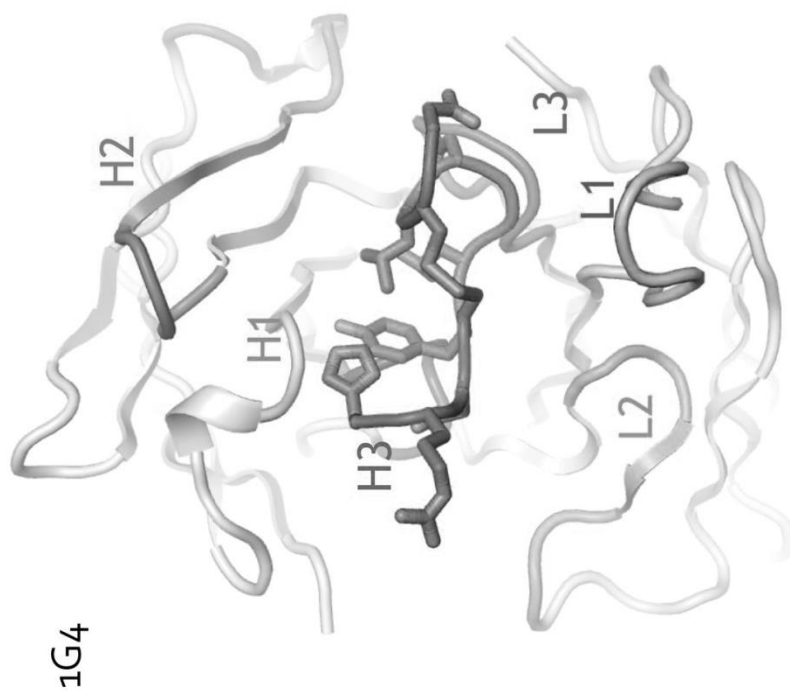
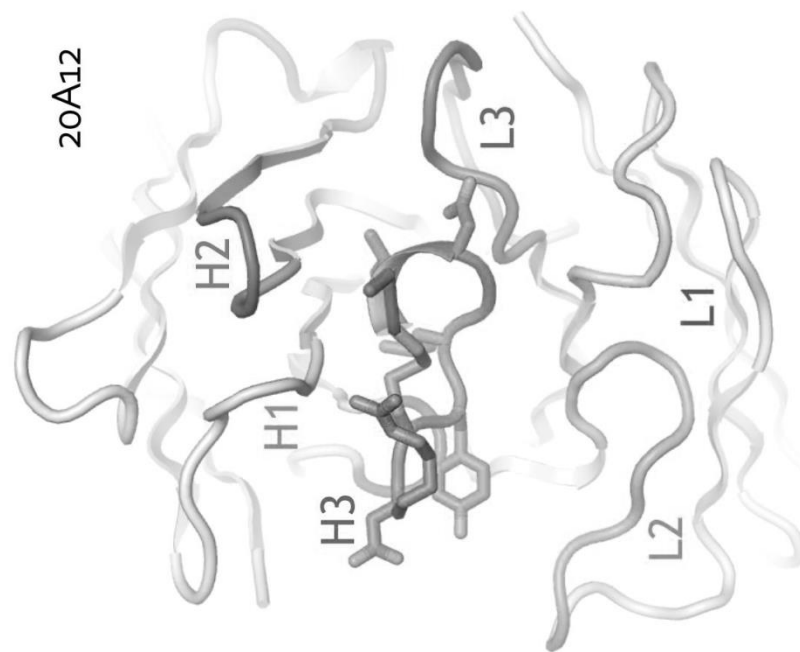


Figura 7B



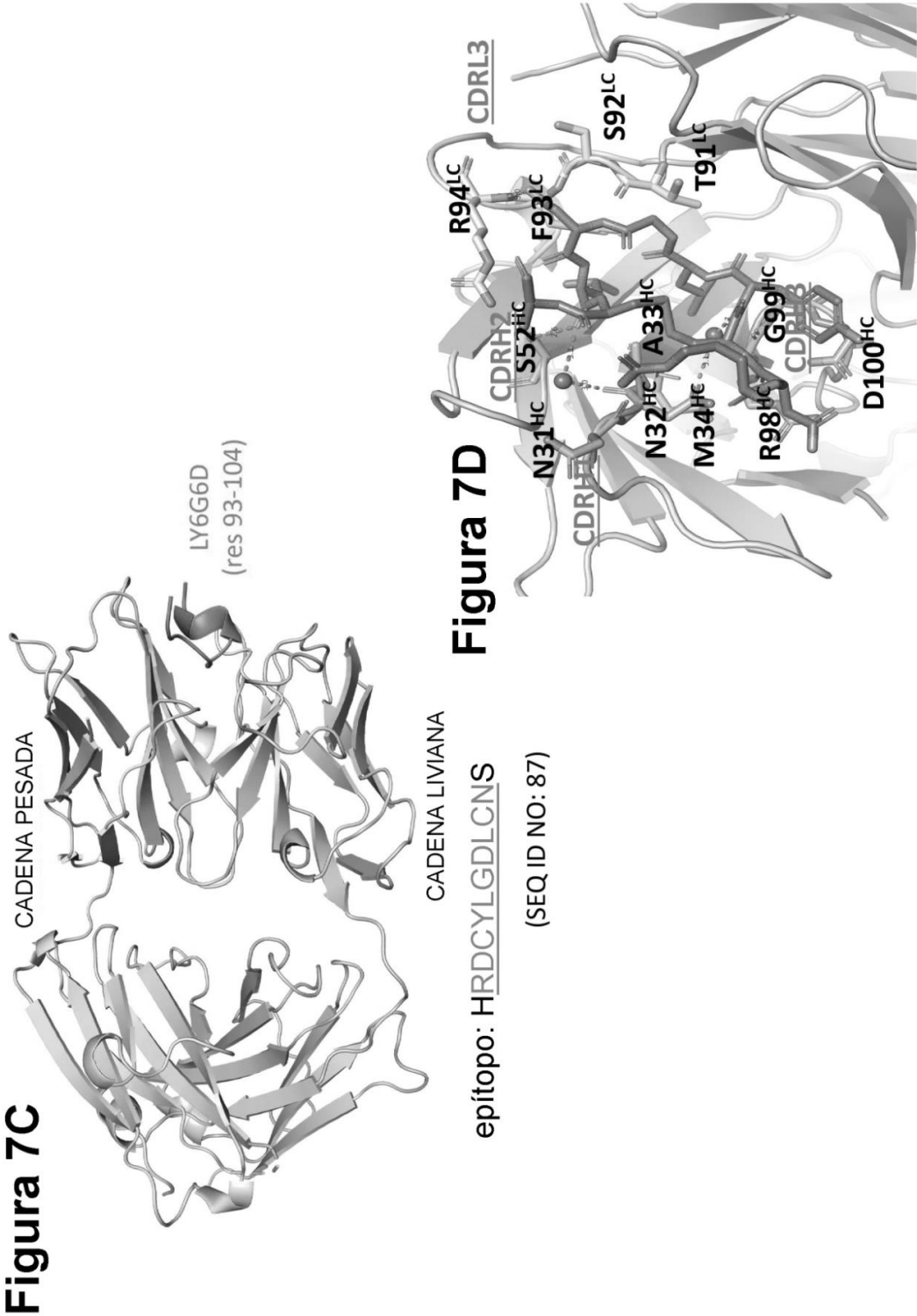
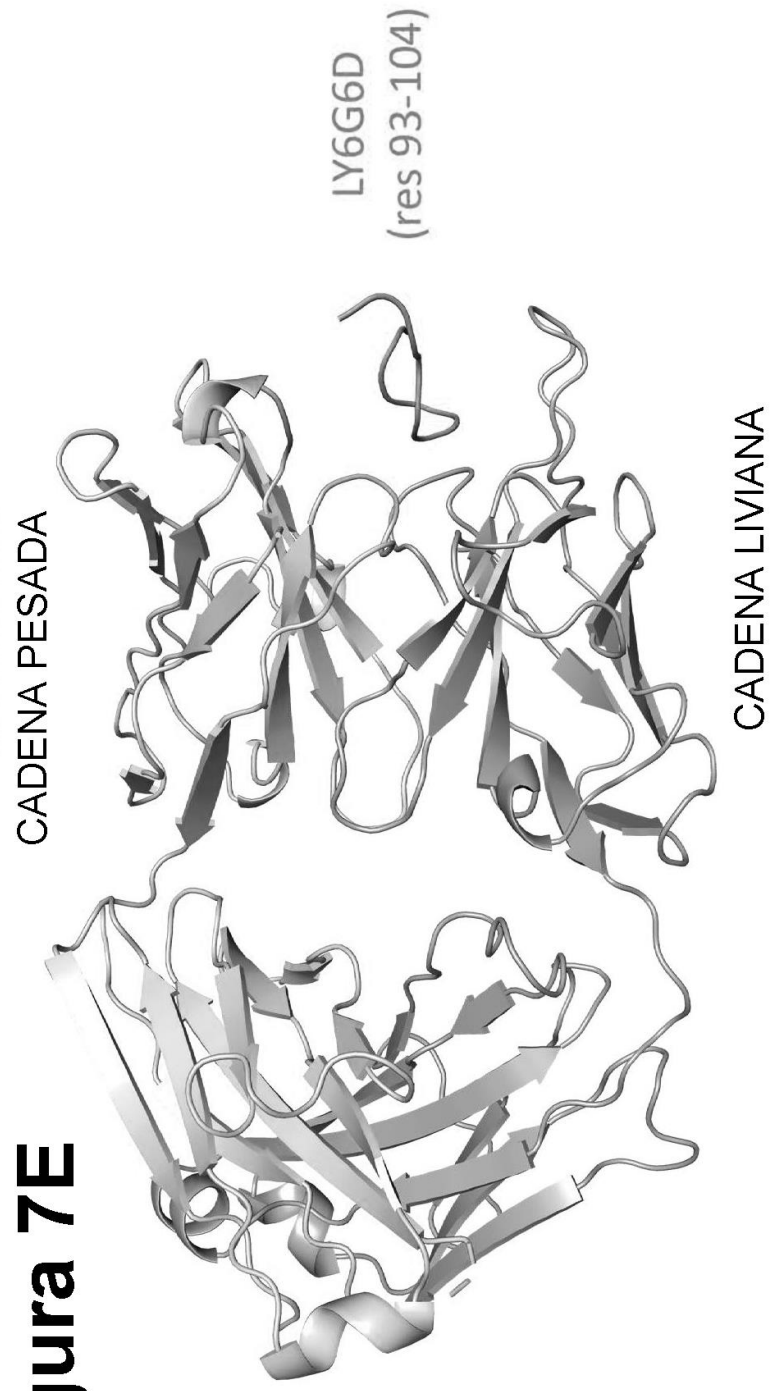


Figura 7E



Epítipo: HRDCYLGDLCNS

(SEQ ID NO: 87)

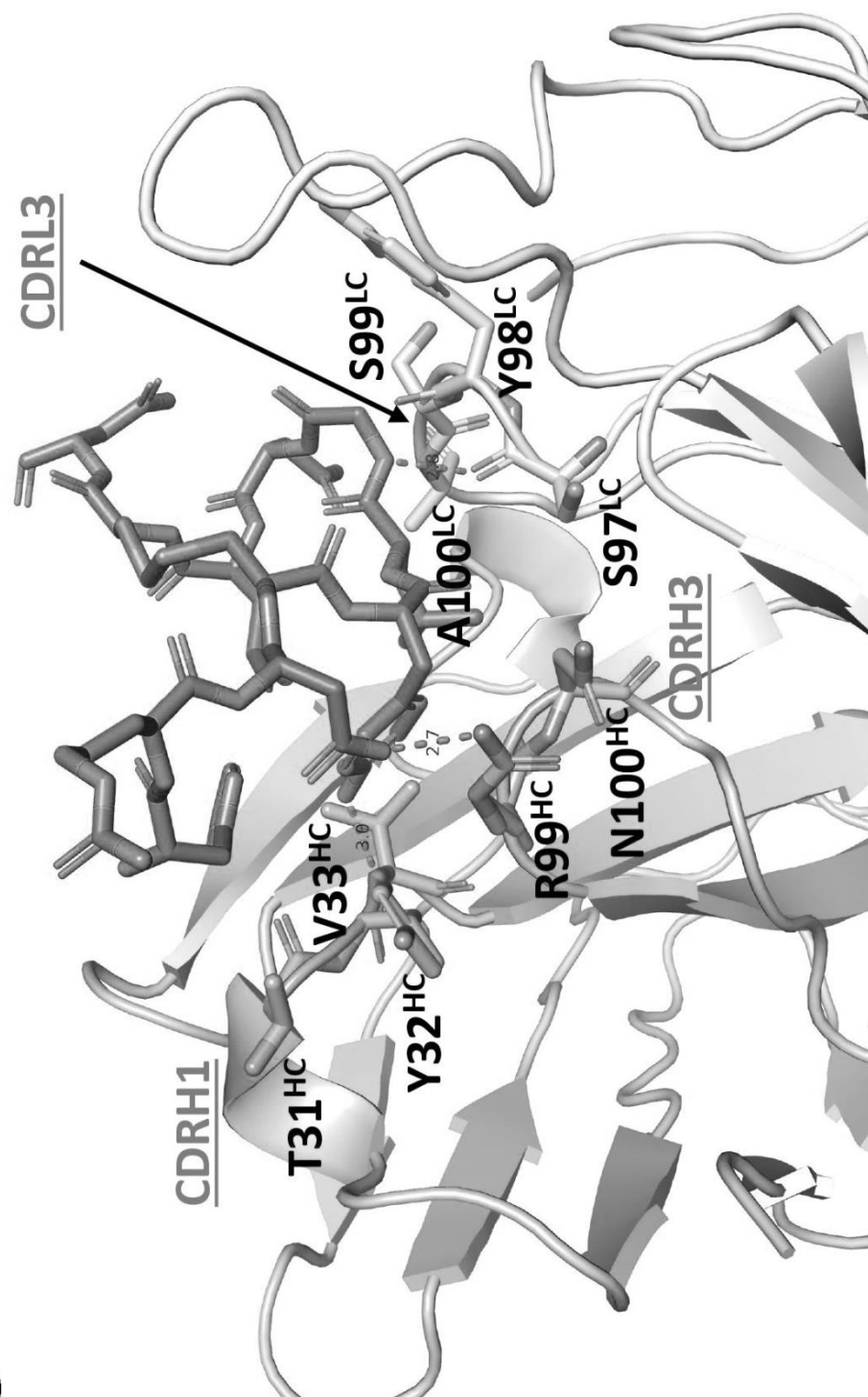
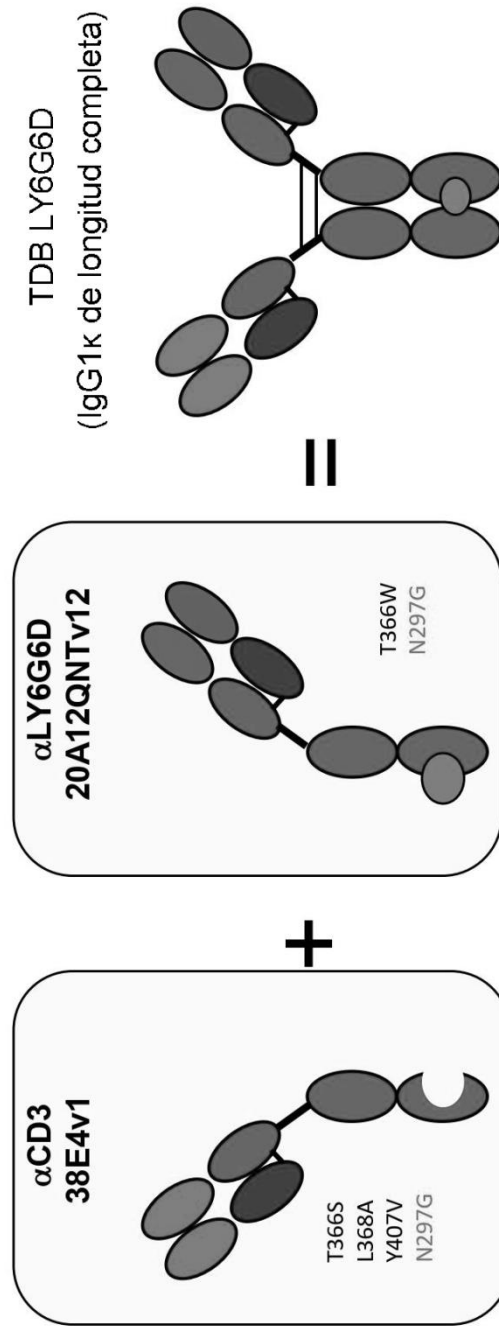
Figura 7F

Figura 8A

Anticuerpo biespecífico humanizado producido en CHO (botón/ojal, N297G)



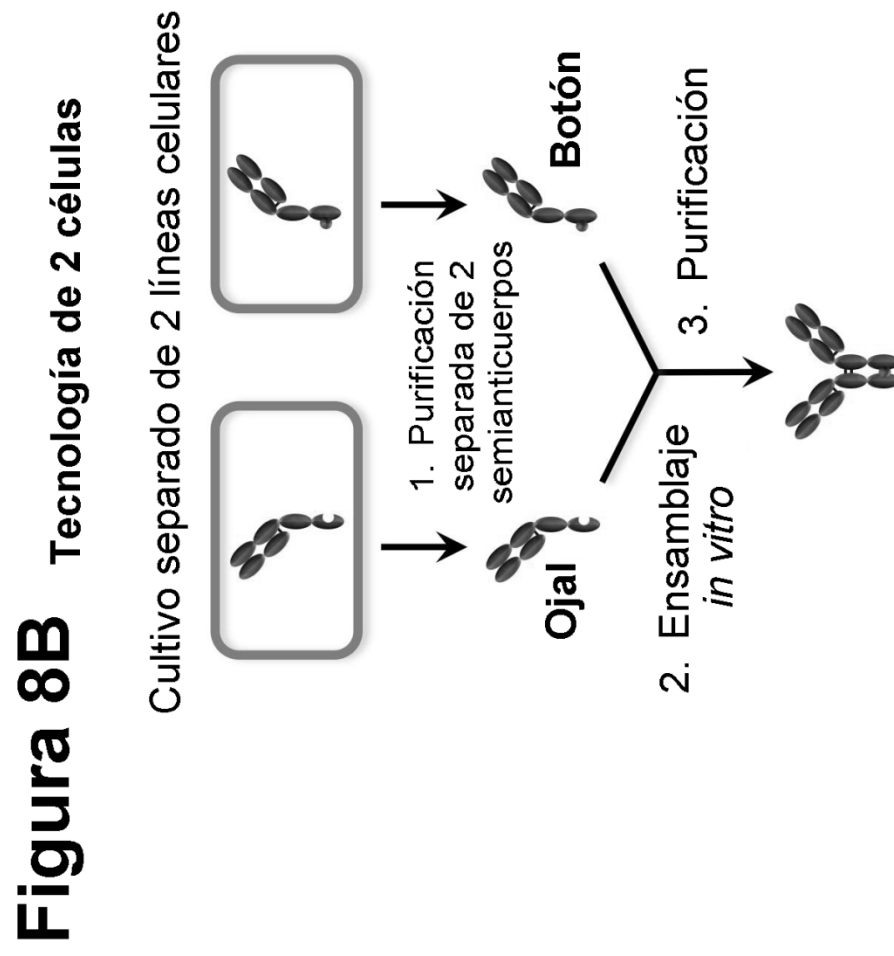


Figura 8C

Tecnología de 1 célula

Cultivo de 1 línea celular

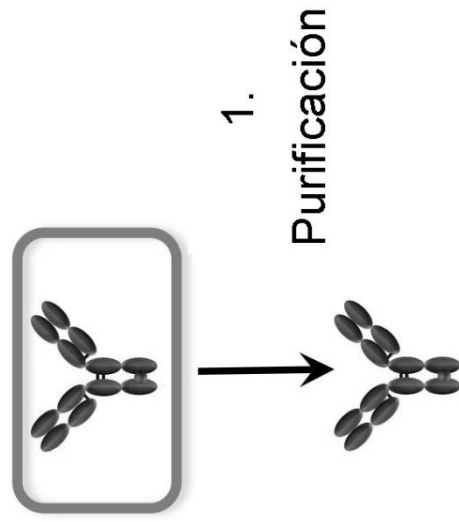


Figura 8D

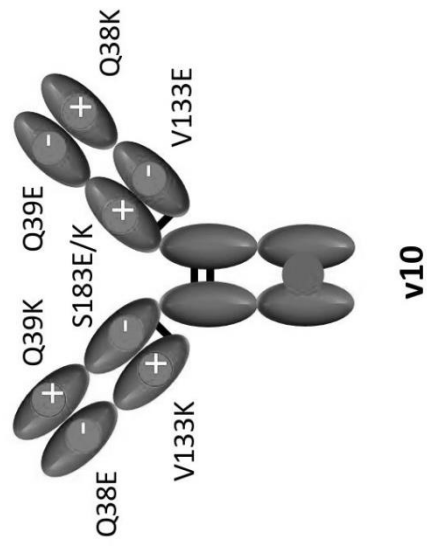
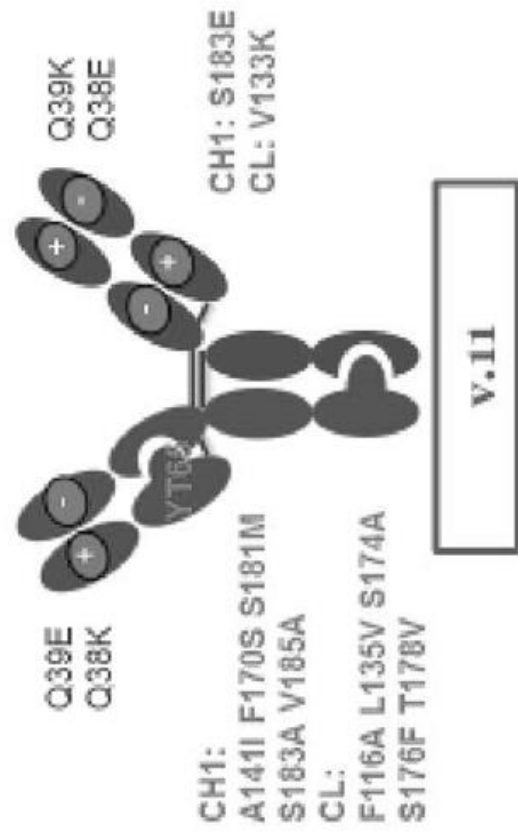


Figura 8E



QQ + Rosetta + Racional

Figura 9A

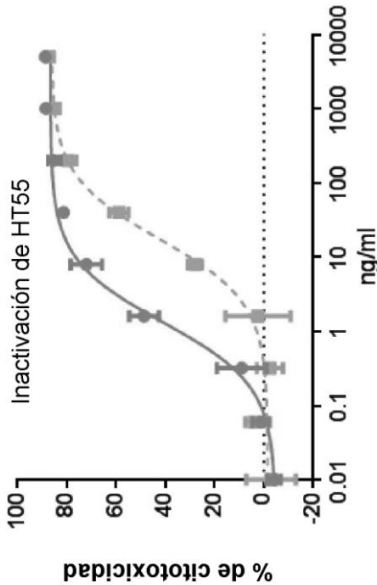


Figura 9B

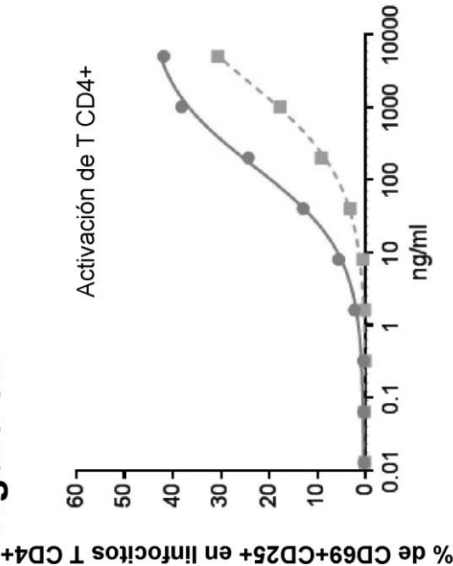
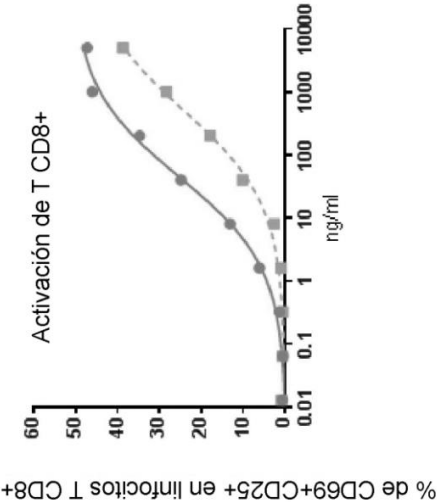


Figura 9C



20A12.QNTV12/38E4v1
20A12.QNTV12/40G5c

Figura 10A

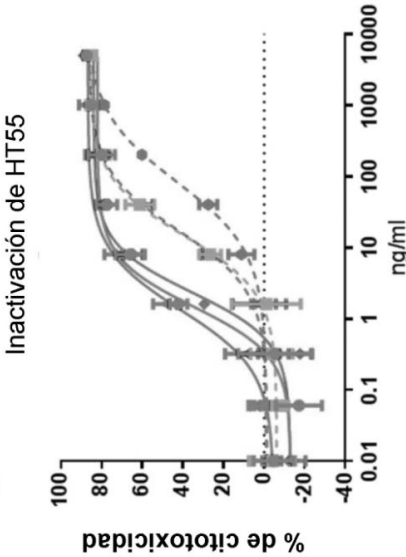


Figura 10B

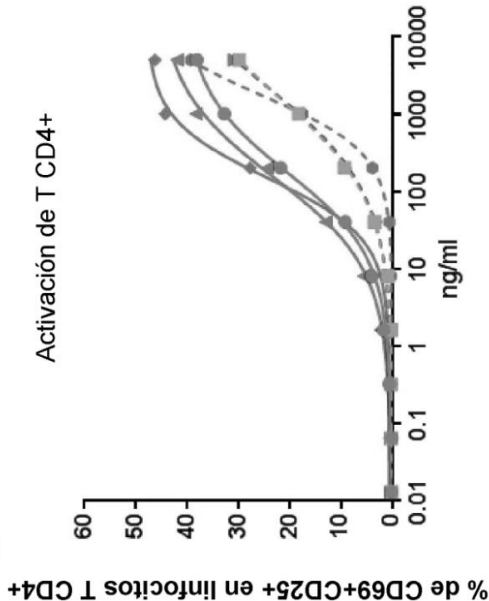
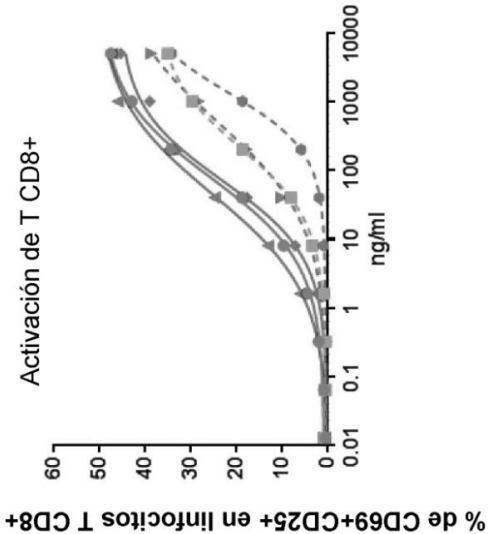


Figura 10C



- 20A12.v1/38E4v1
- 20A12.v1/40G5c
- 20A12.QNTv12/38E4v1
- 20A12.QNTv12/40G5c
- 1G4/38E4v1
- 1G4/40G5c

Figura 10D

Inactivación de HT55

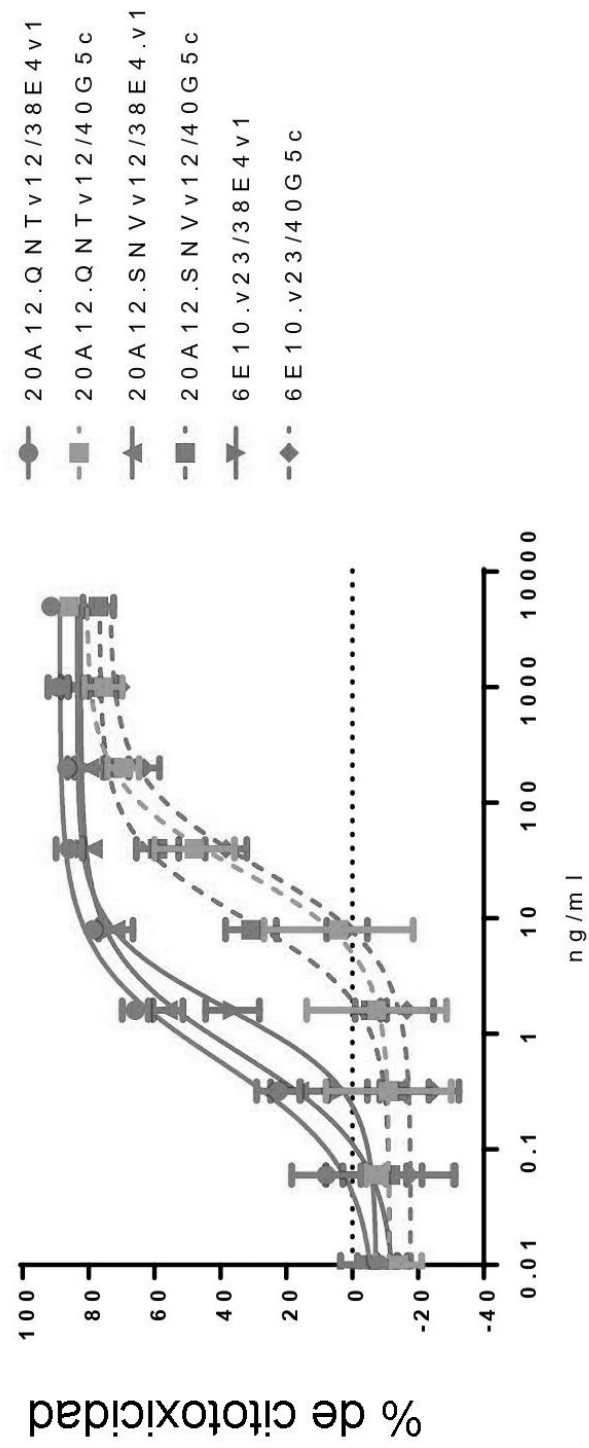


Figura 11A

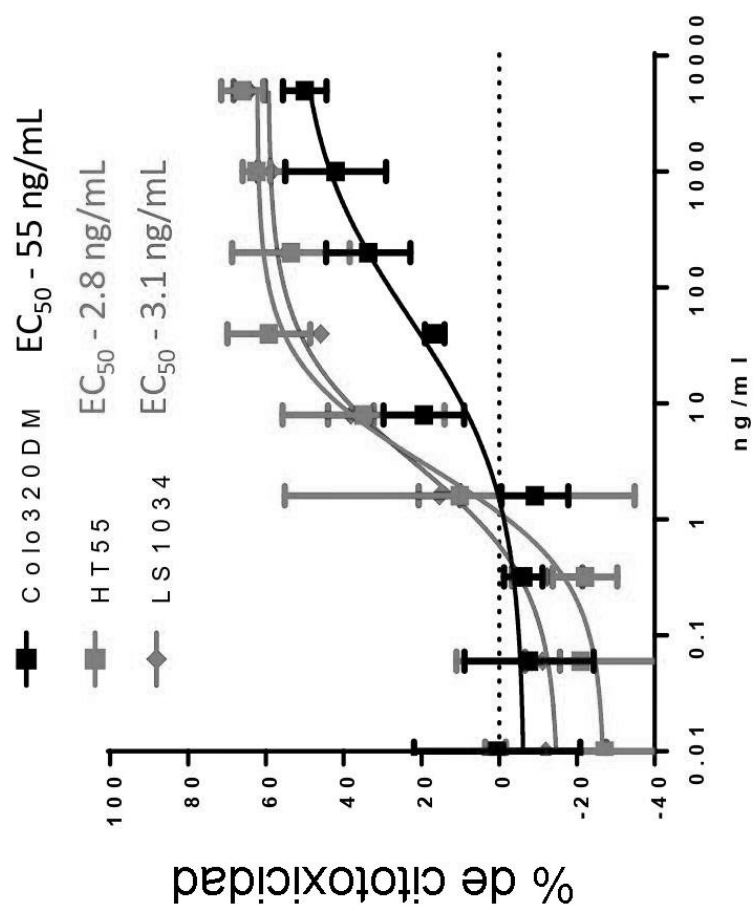
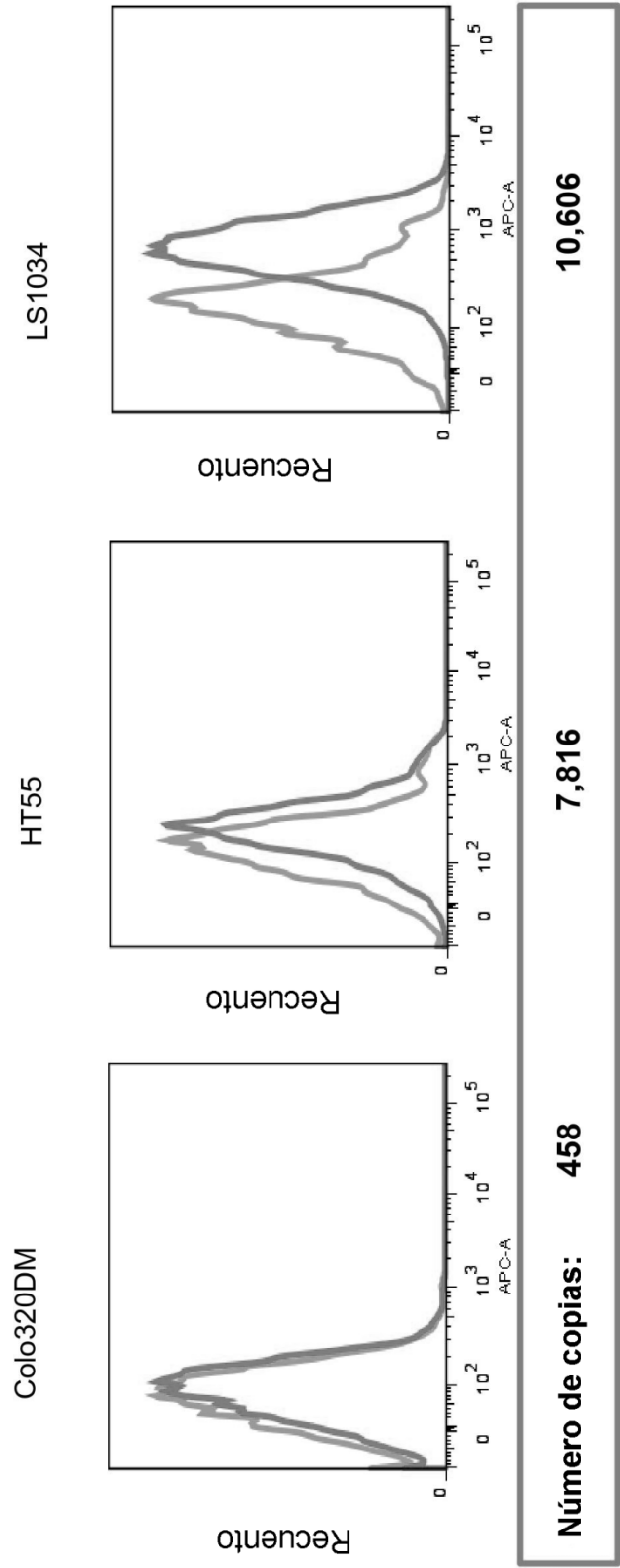
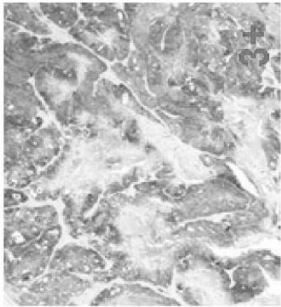
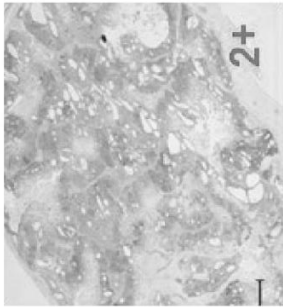
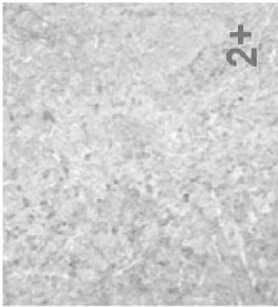


Figura 11B



IHC
(Xenoinjerto)



IHC
(Pelet celular)

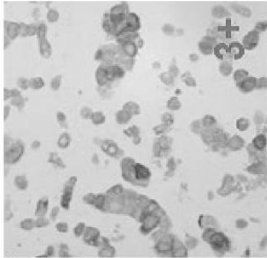
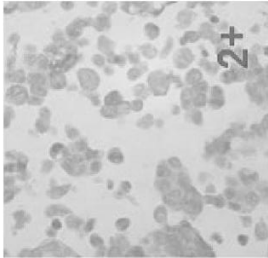
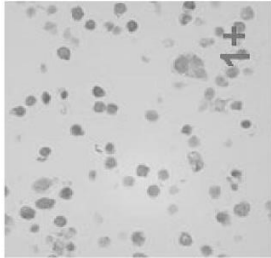


Figura 11C

Colo320DM

HT55

LS1034

Figura 11D

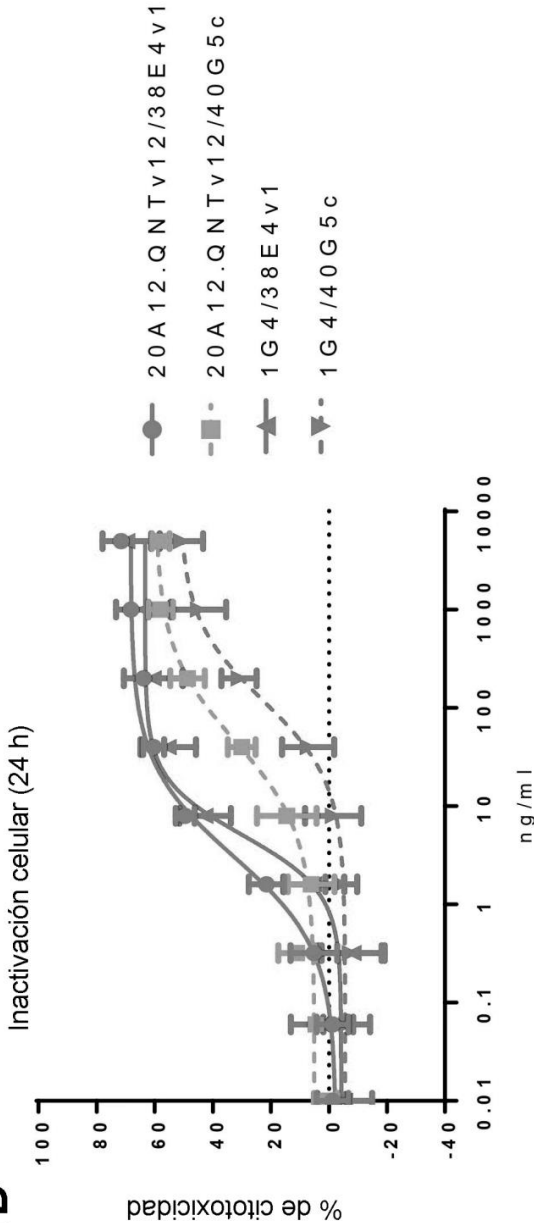


Figura 11E

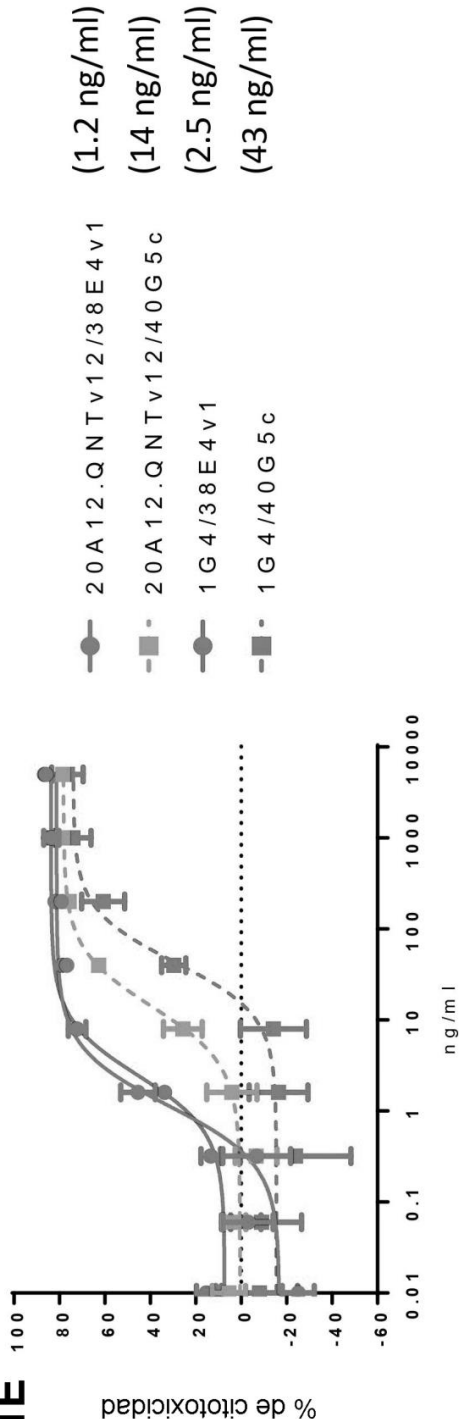


Figura 11F

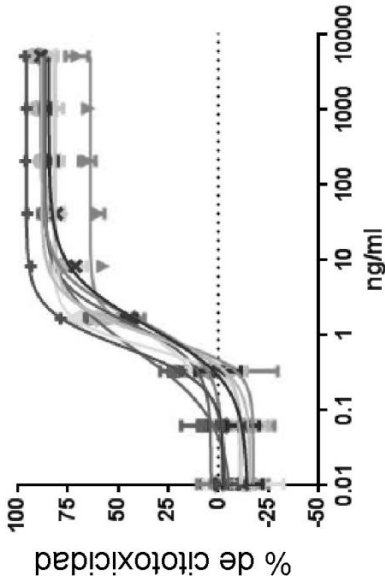


Figura 11G

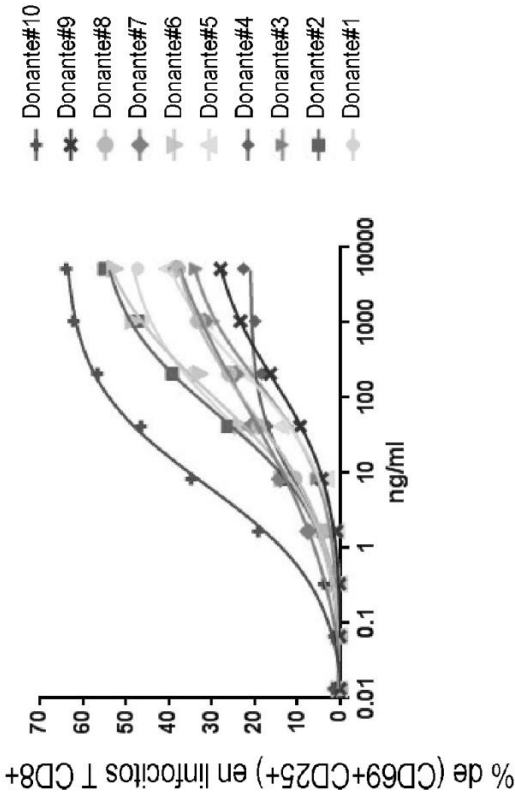


Figura 11H

EC50 (ng/ml)	Donante#1	Donante#2	Donante#3	Donante#4	Donante#5	Donante#6	Donante#7	Donante#8	Donante#9	Donante#10	Promedio	SD
Inactivación celular	1.322	0.5913	0.7991	1.420	0.6606	0.9859	1.687	1.017	1.260	0.6592	1.04	0.37
Activación de T CD8+	44.96	55.95	146.9	6.832	214.3	98.29	72.78	56.73	167.9	6.697	87.1	69.3

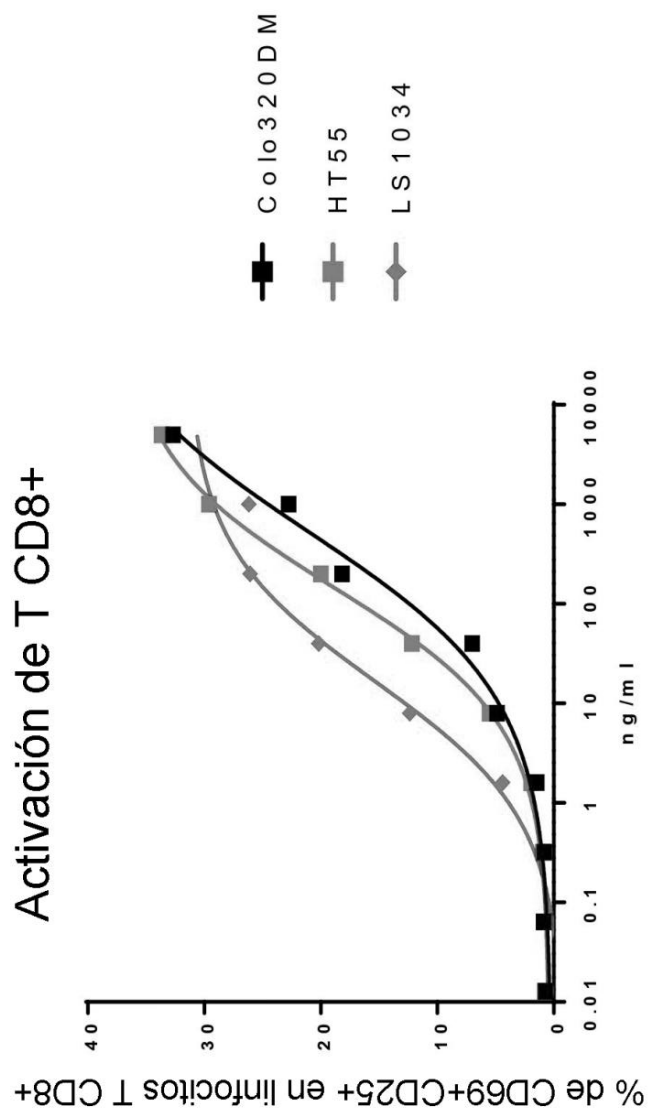
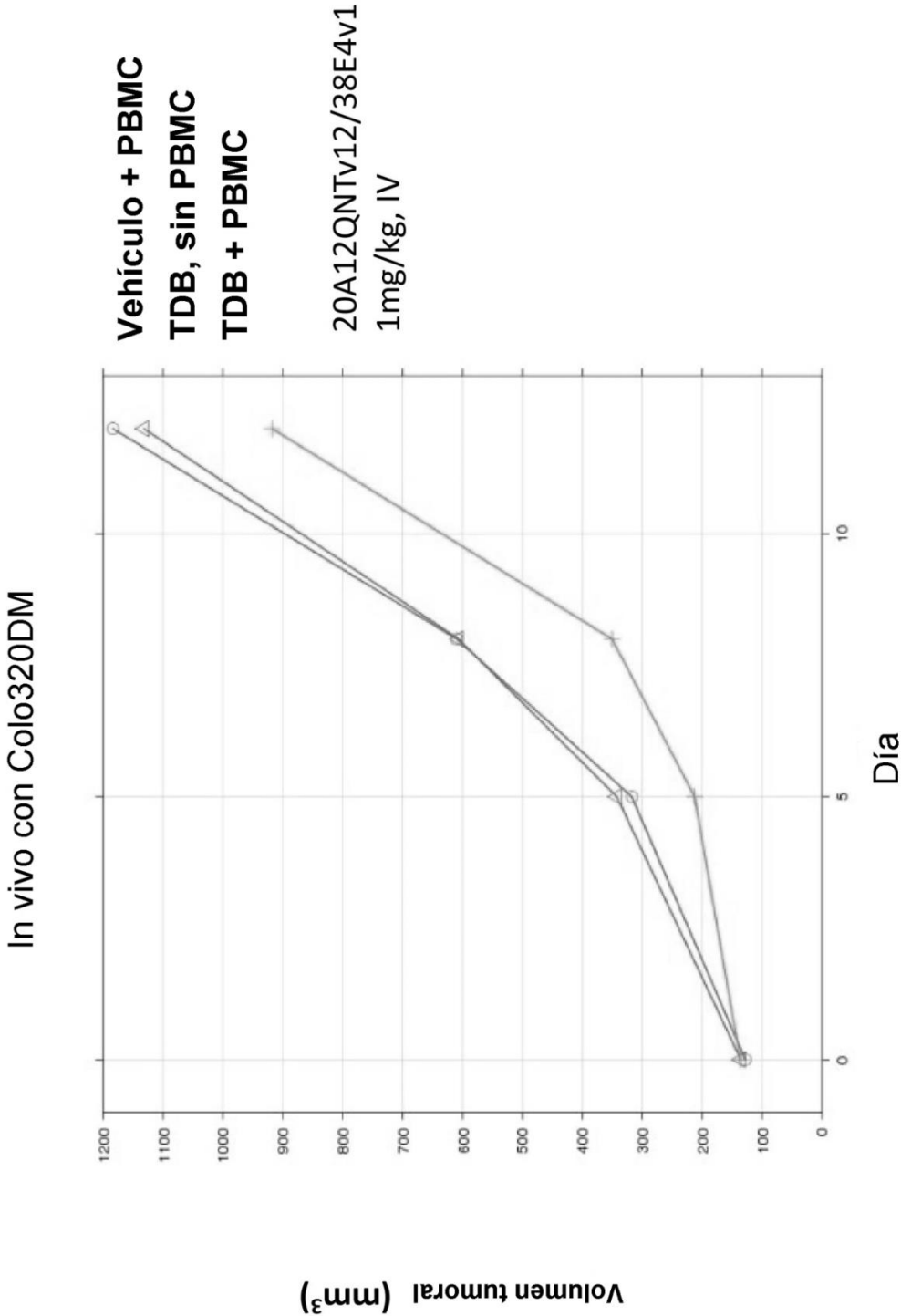
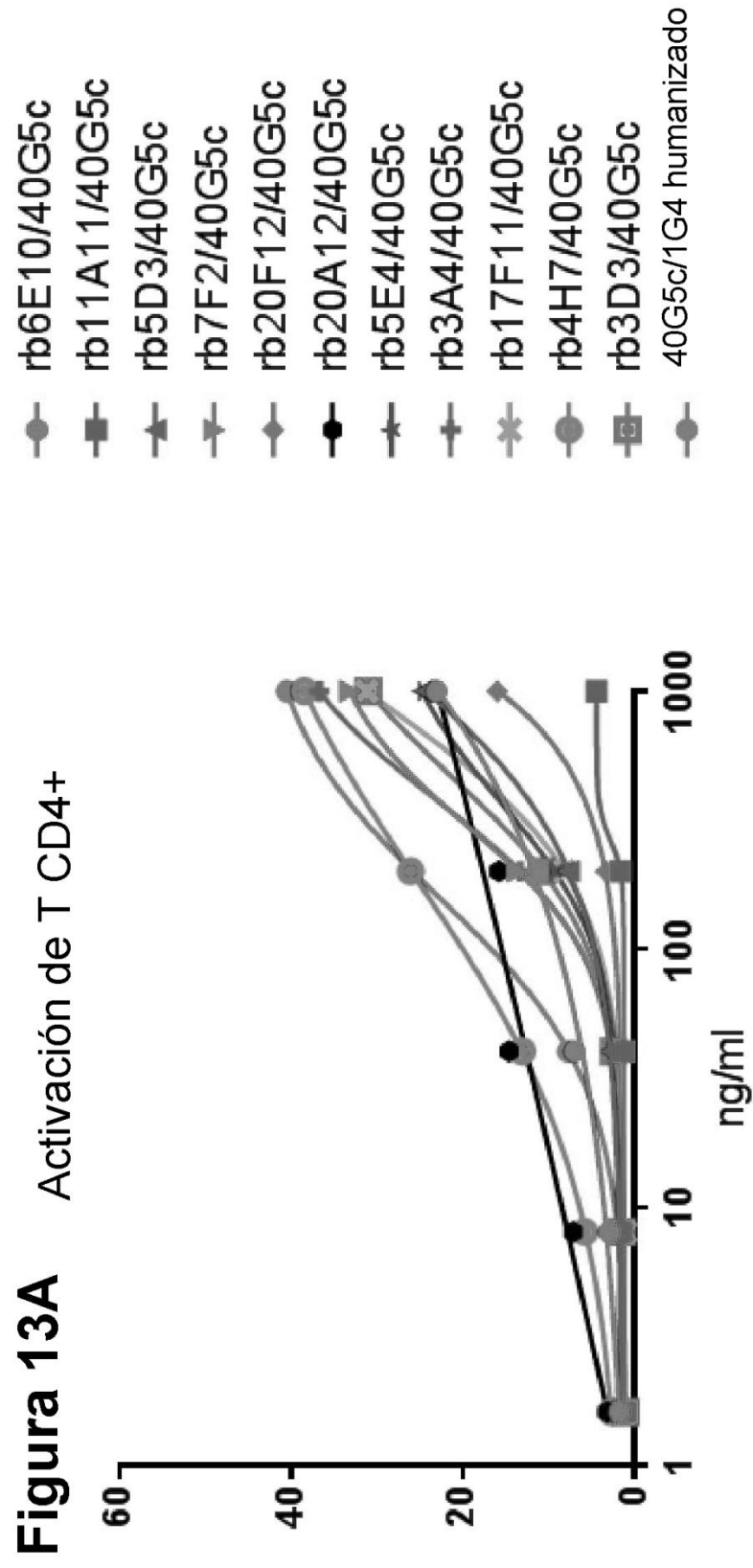
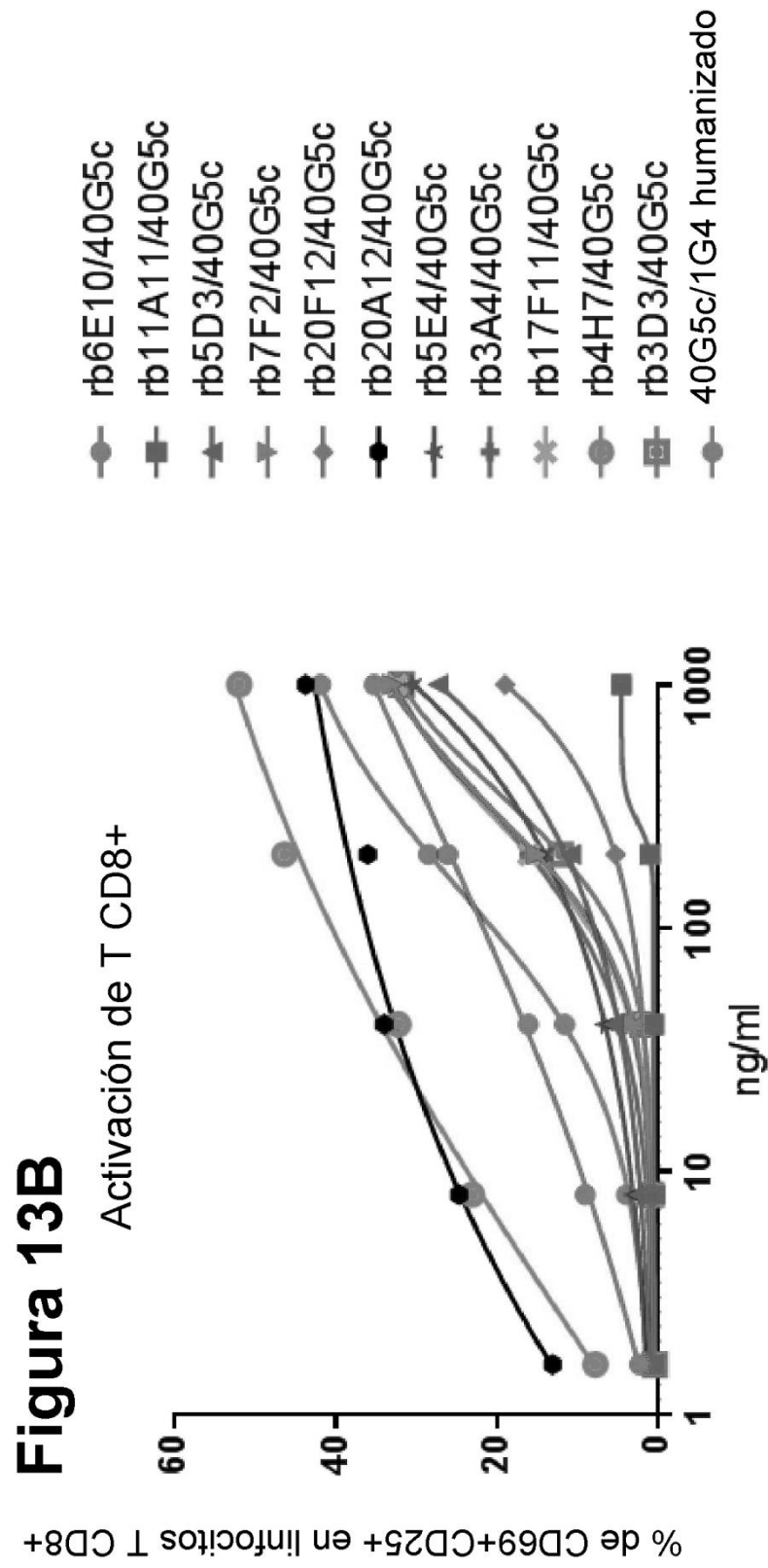
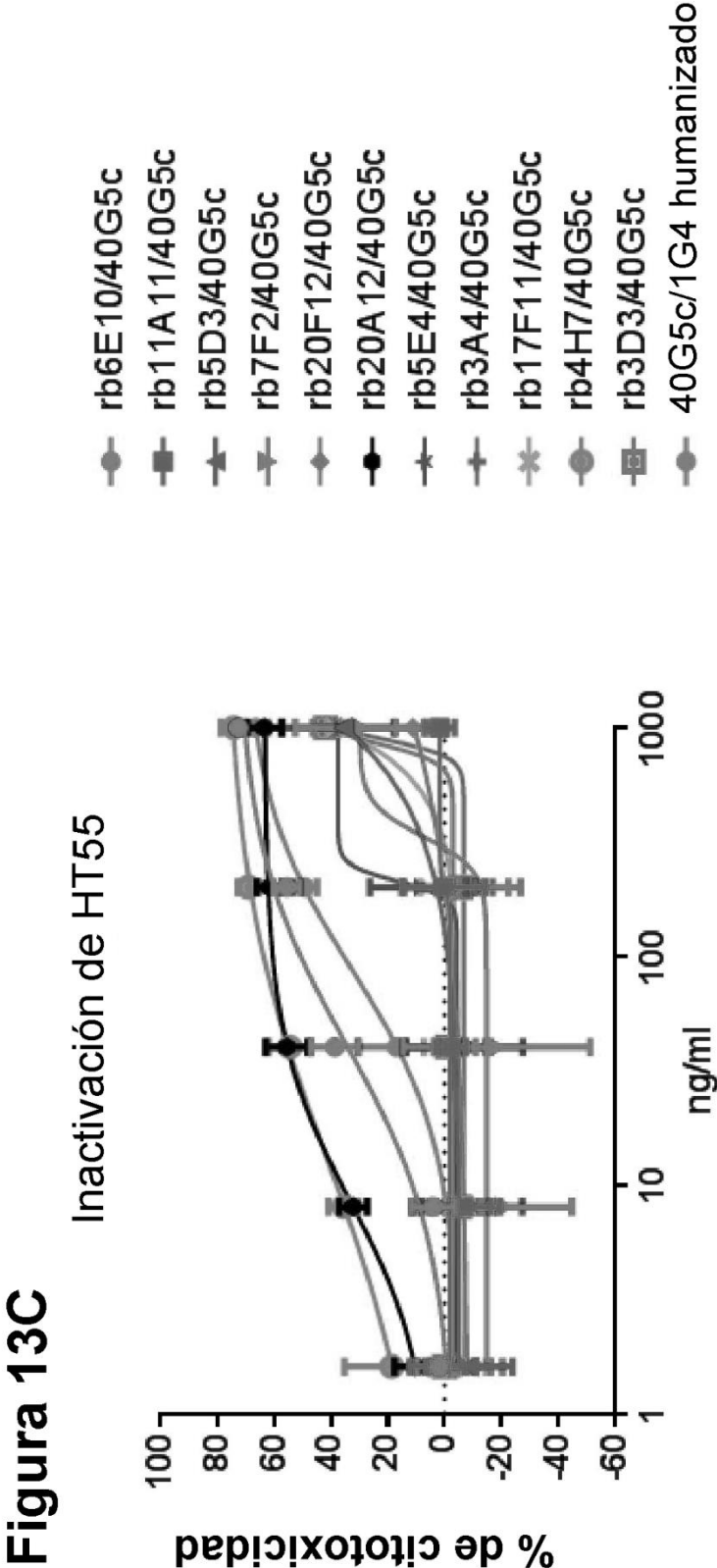
Figura 11I

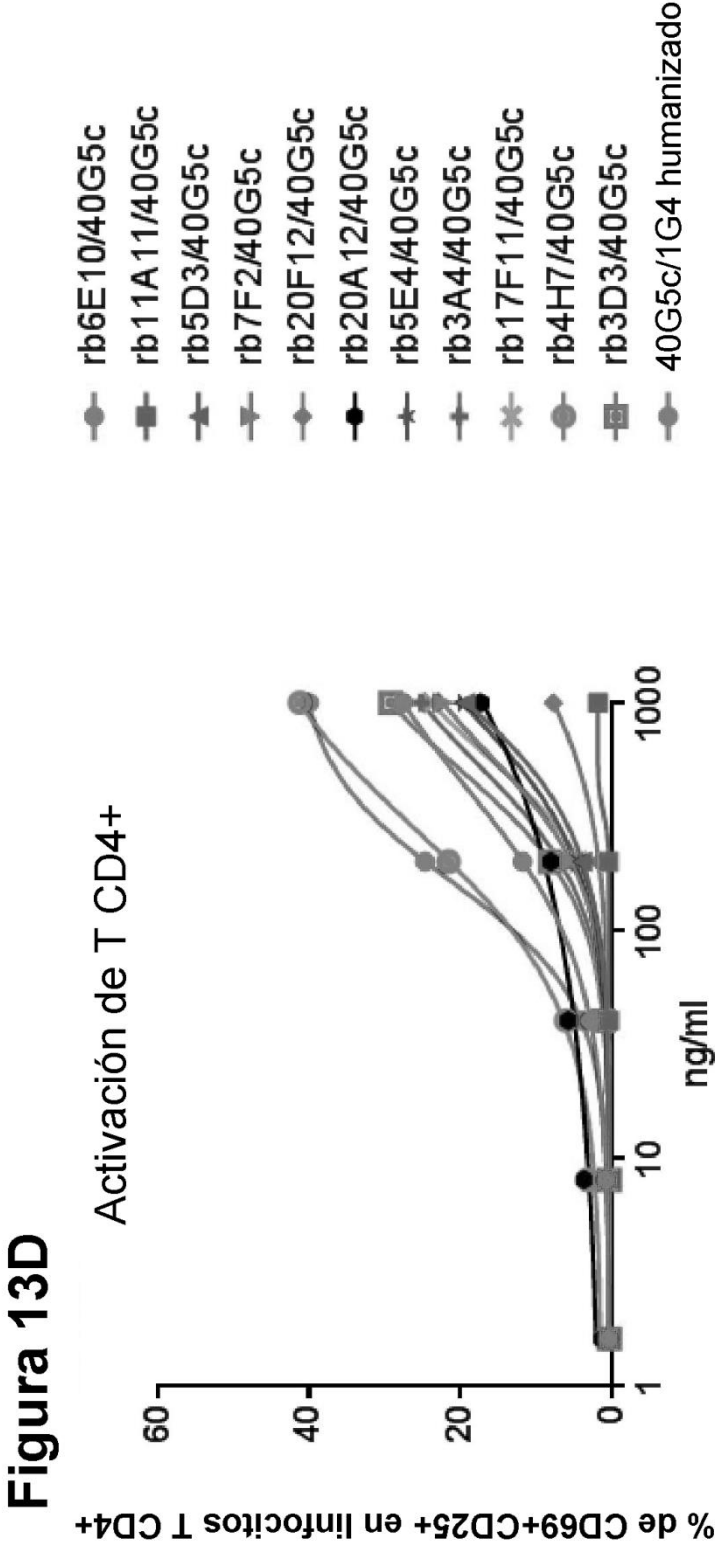
Figura 12











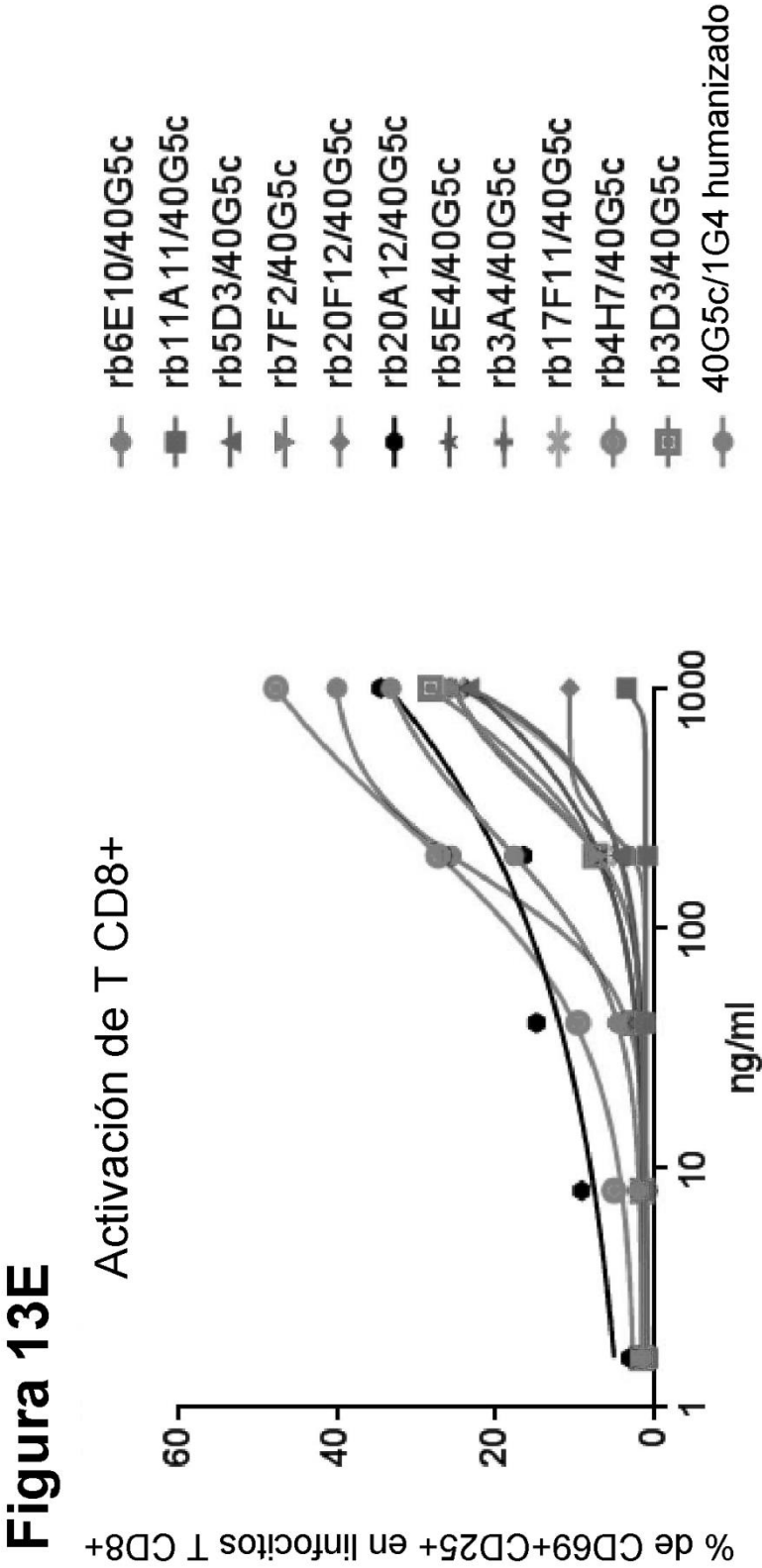


Figura 14A

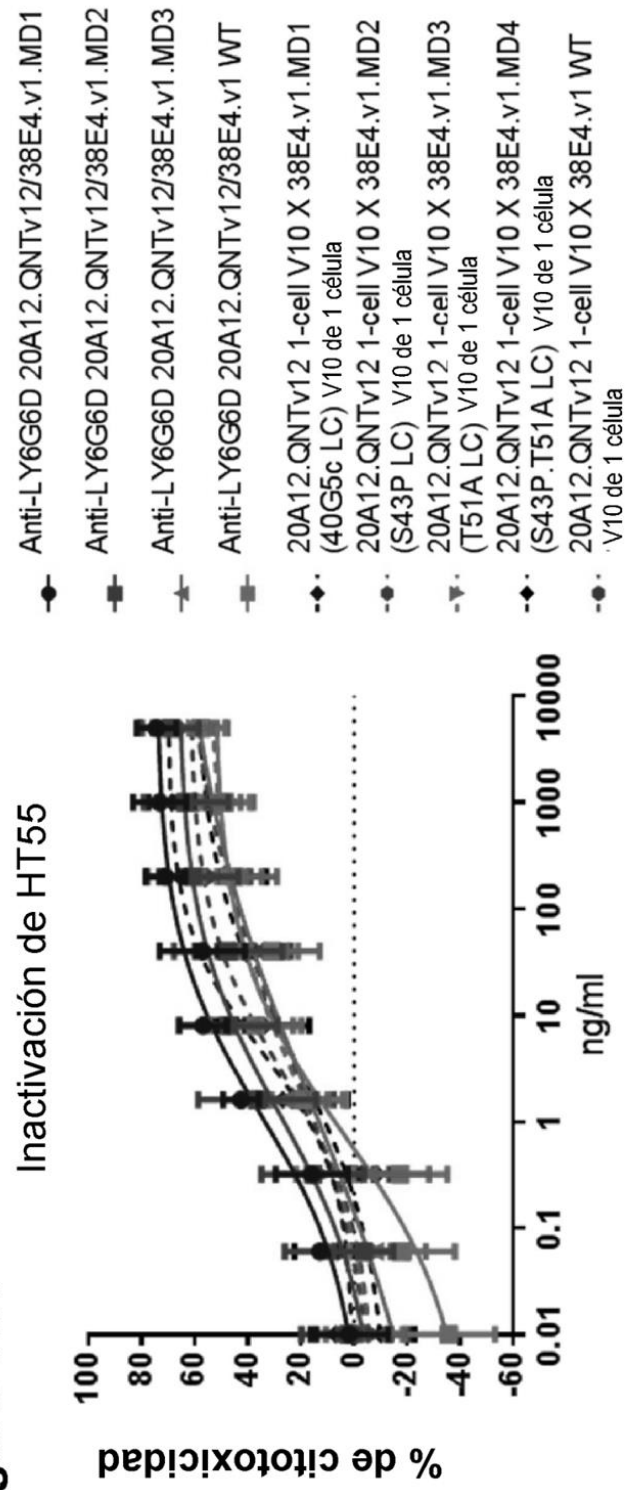


Figura 14B

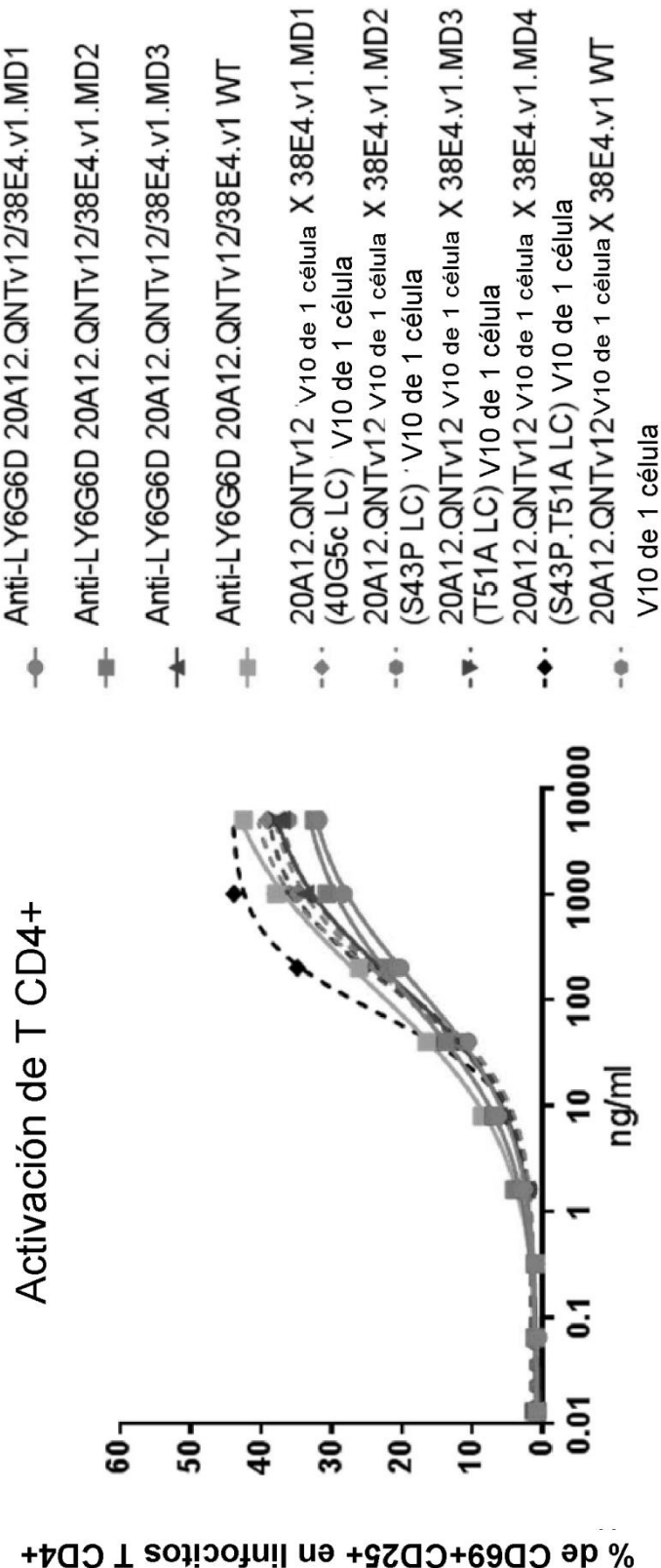


Figura 14C Activación de T CD8+

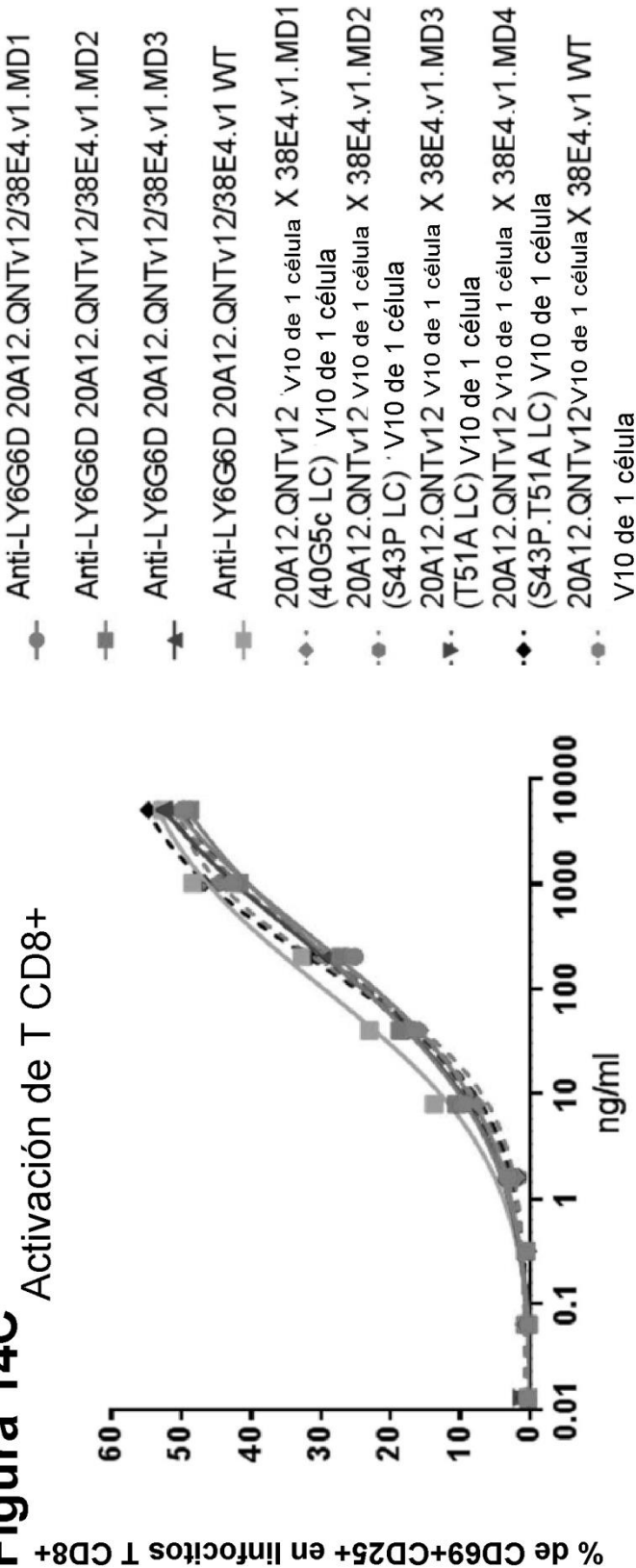
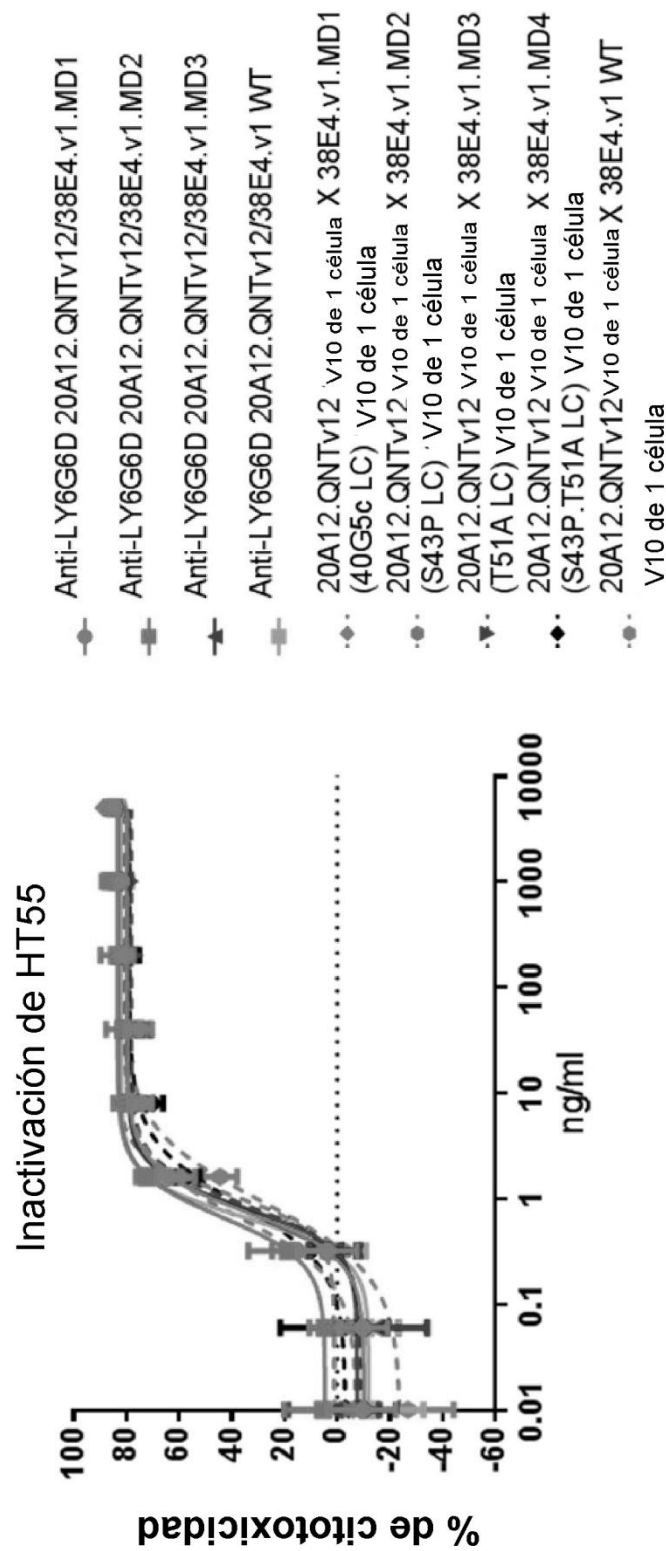


Figura 15A



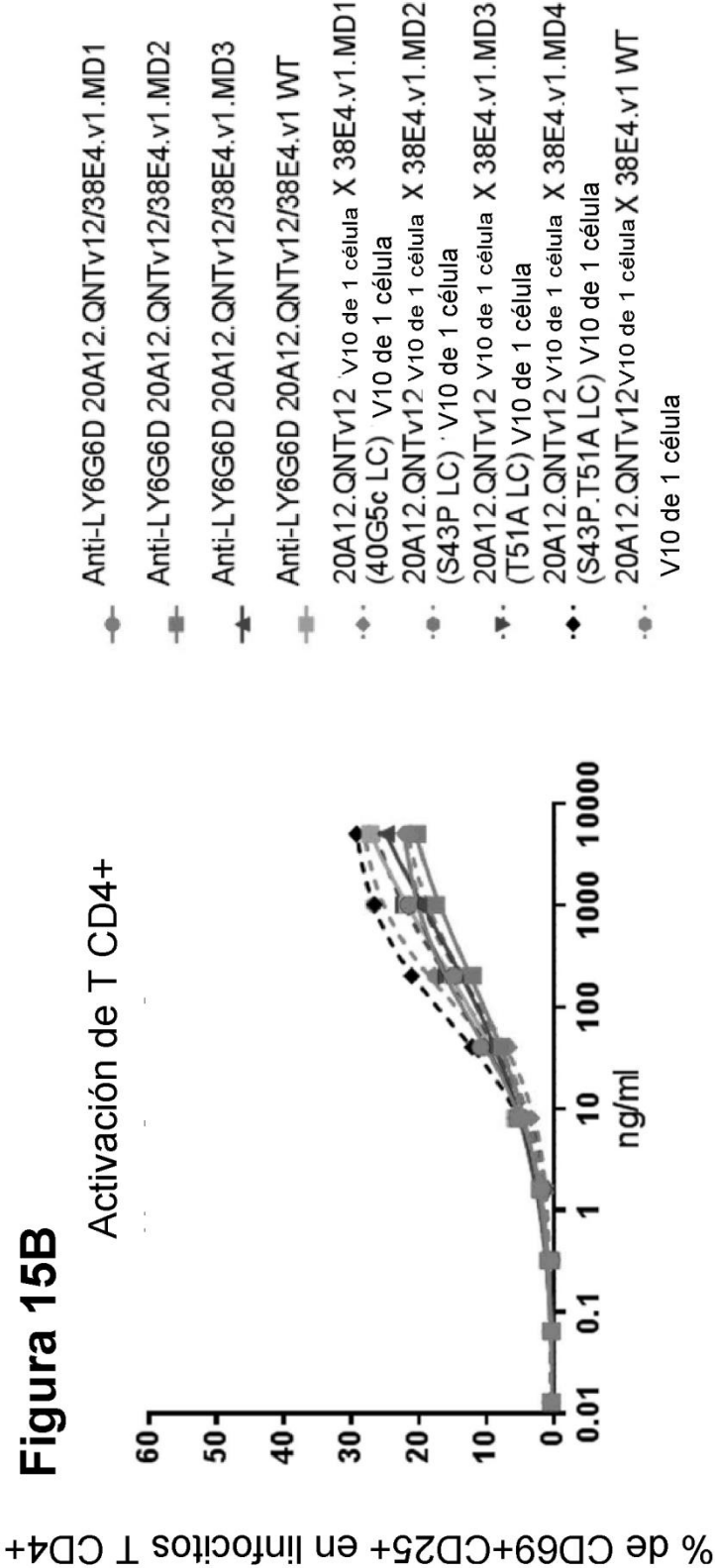
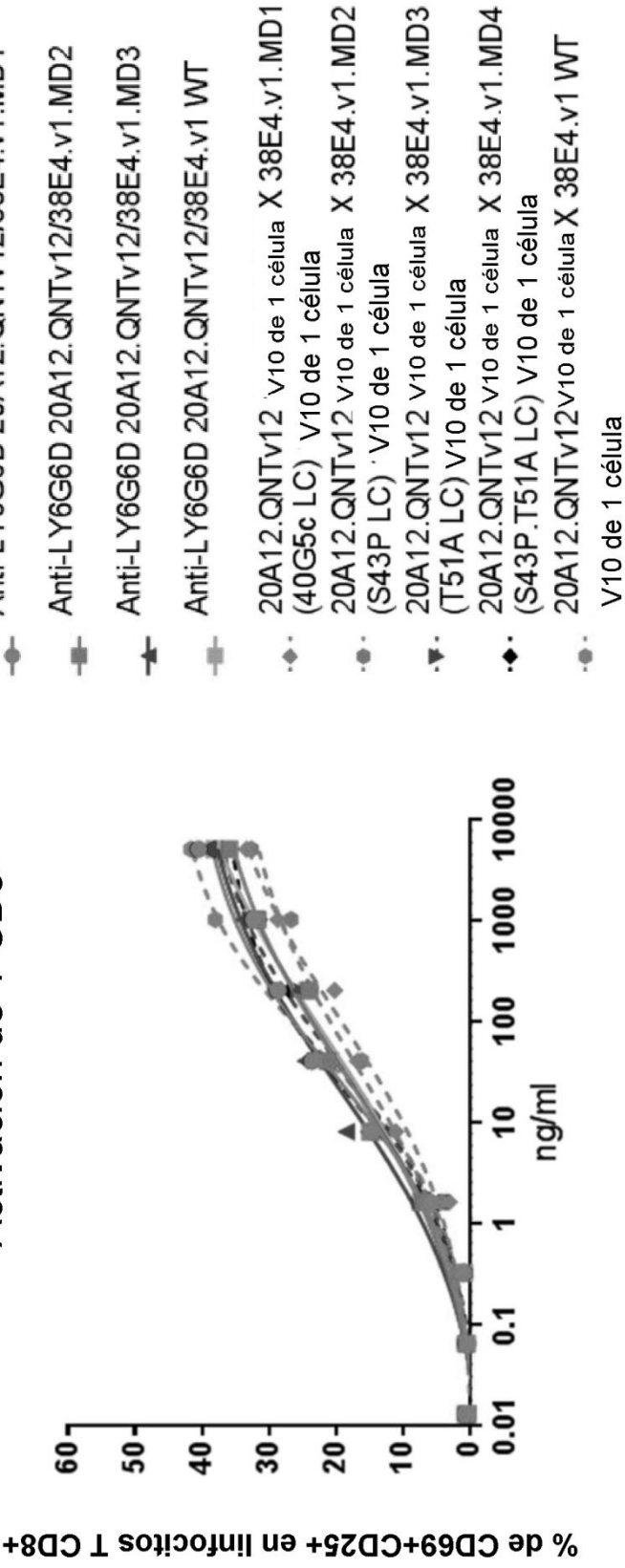


Figura 15C Activación de T CD8+



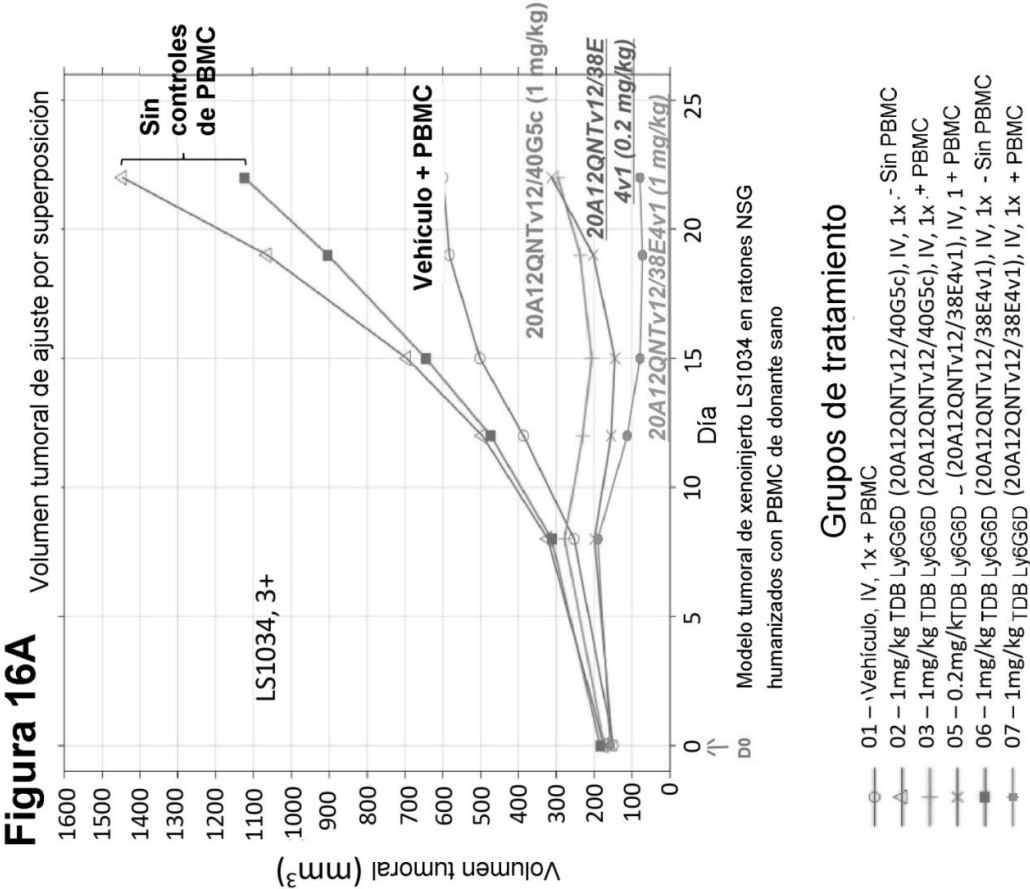


Figura 16B

Perfiles PK en ratón NSG en modelo de LS1034

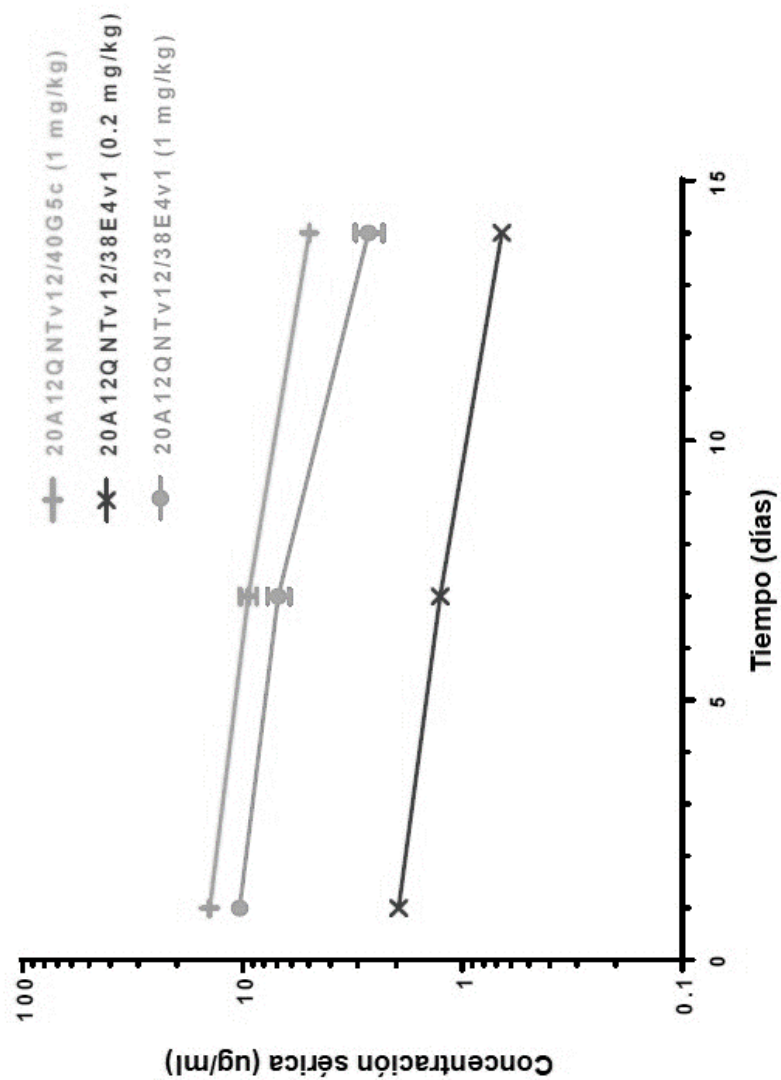


Figura 16C

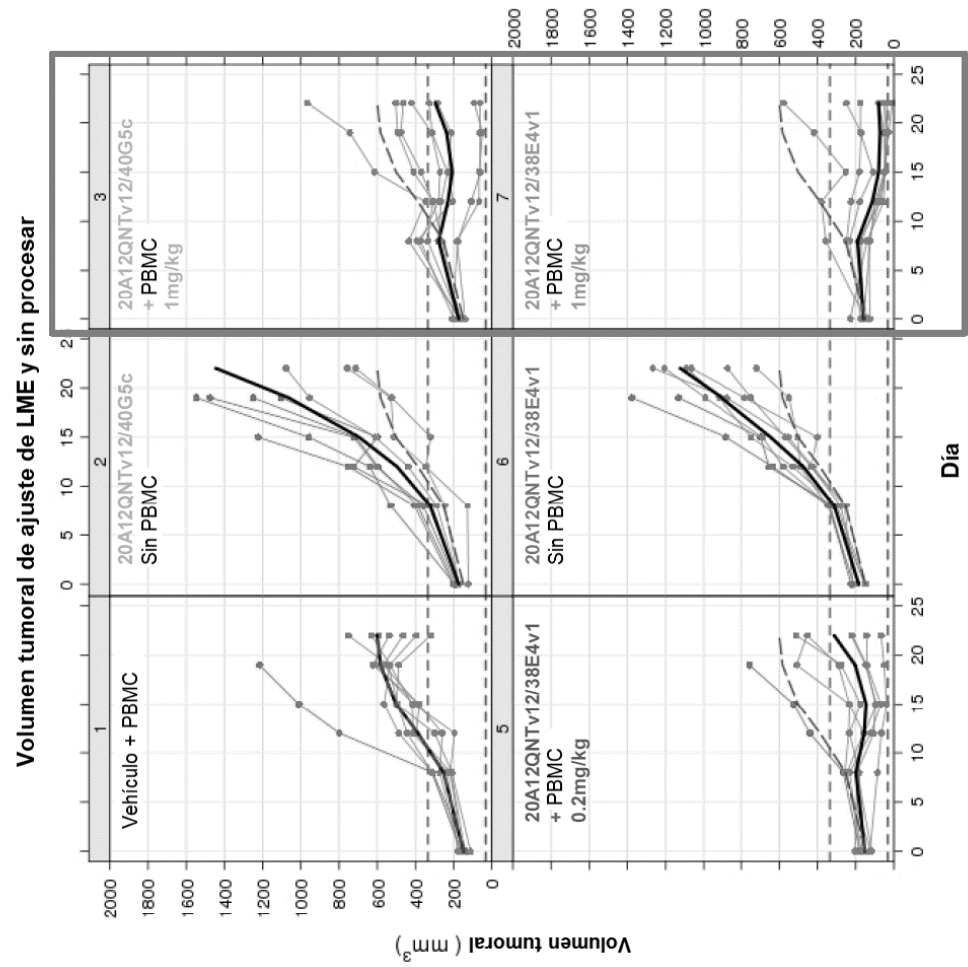


Figura 17B

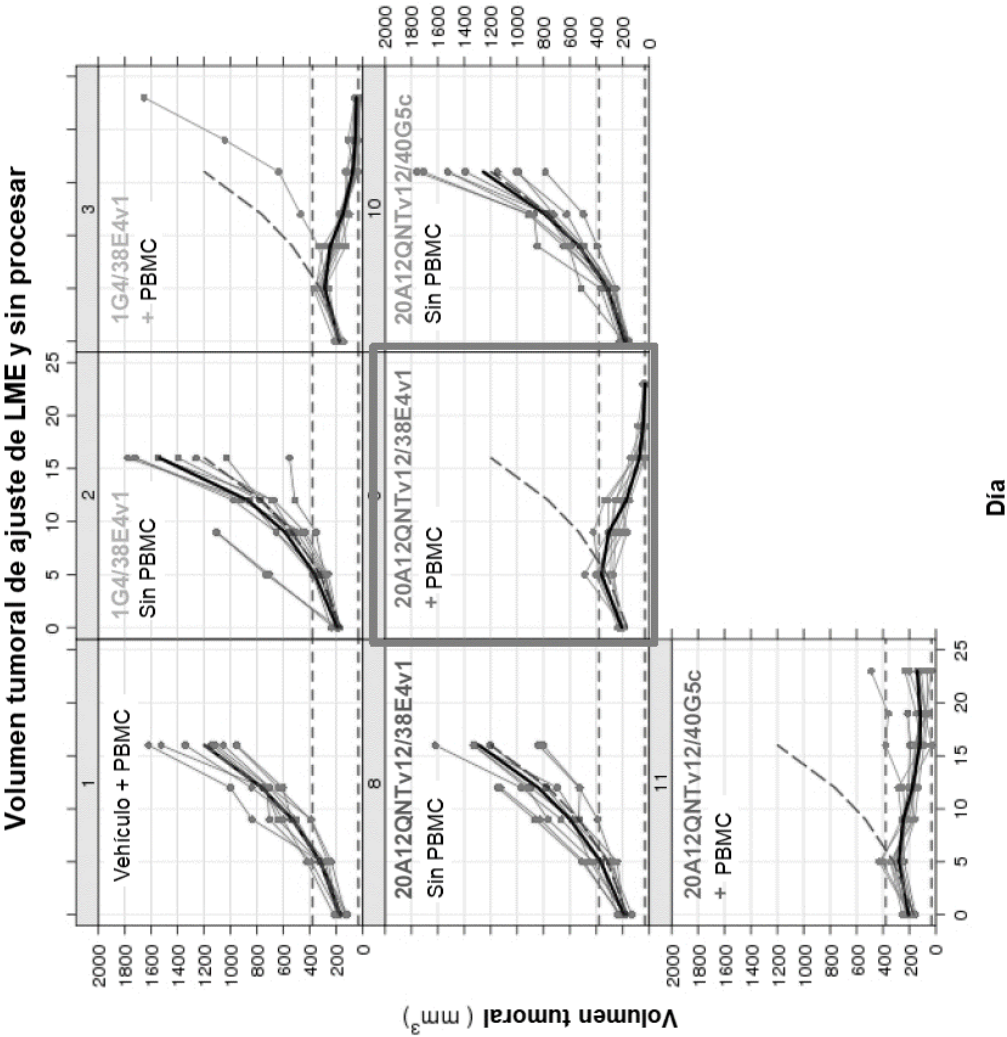


Figura 17C

PK de TDB de LY6G6D en modelo de ratón HT55

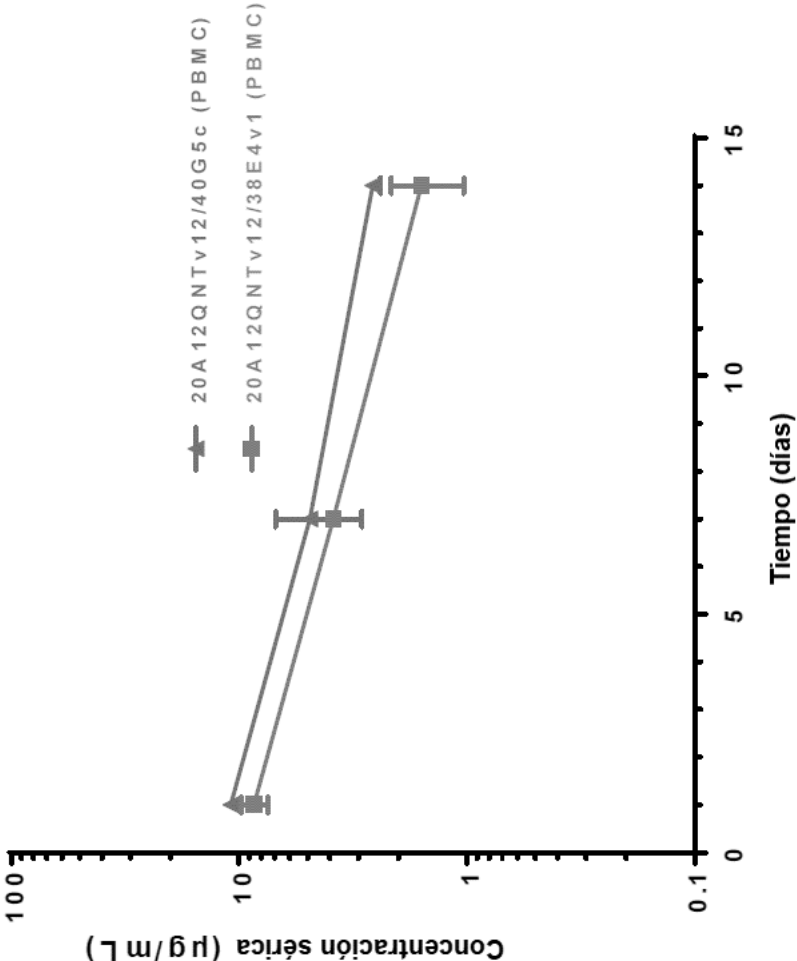
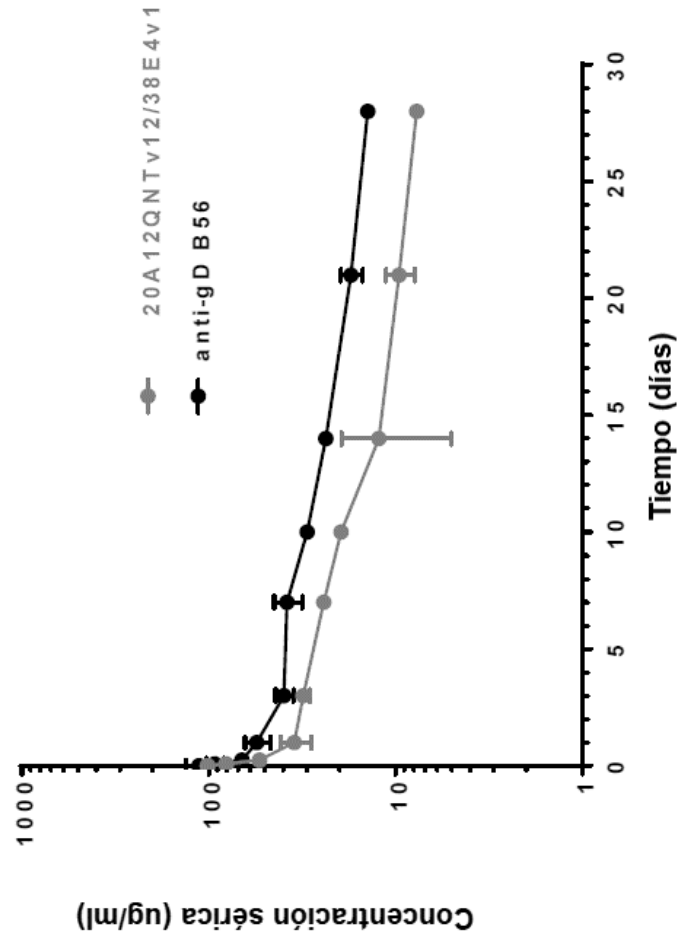


Figura 18

PK intravenosa en ratón SCID a 5 mg/kg



Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC ₀₋₂₈ (día*µg/ml)	CL (ml/día/kg)	t _{1/2} (días)
20A12QNTv.12/38E4.v1 TDB	102	497	7.67	13.9
anti-gD 5B6	113	782	4.53	15.7

Figura 19

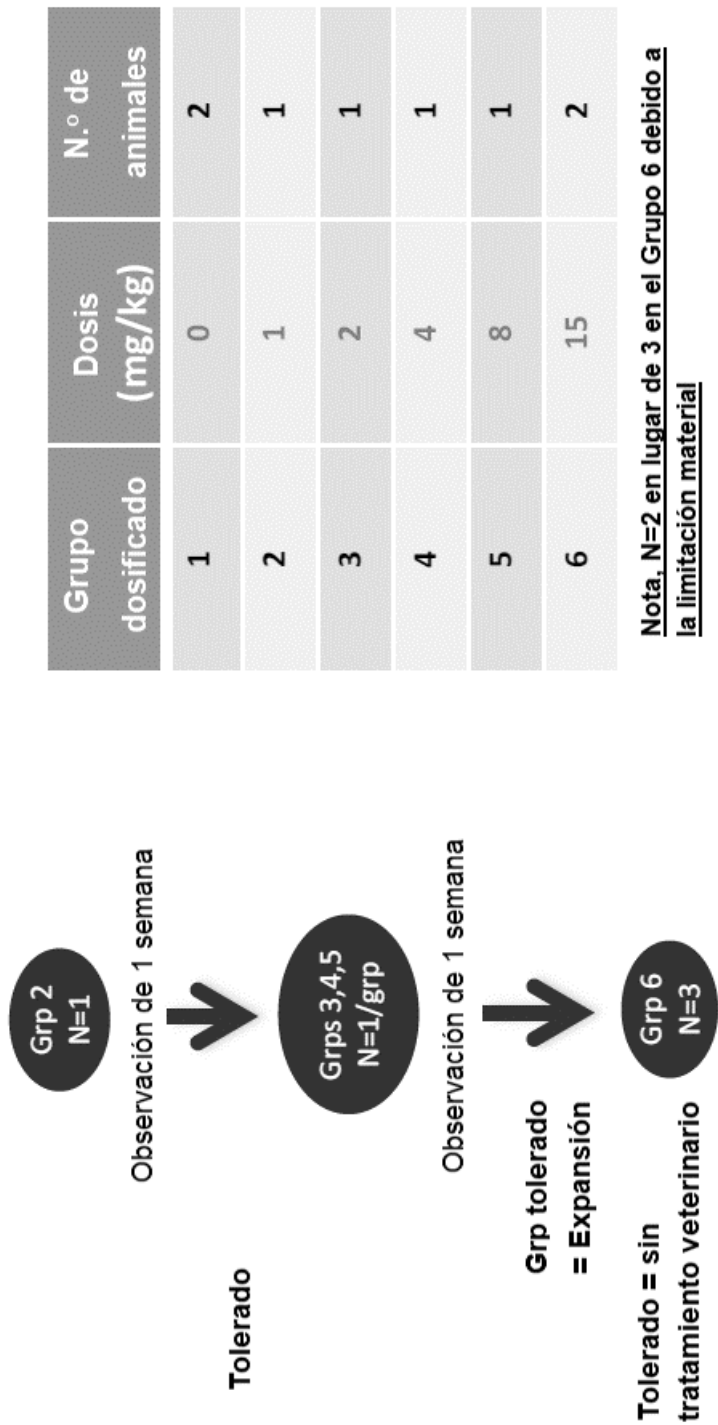


Figura 20A

PK intravenosa en *Macaca Fascicularis*

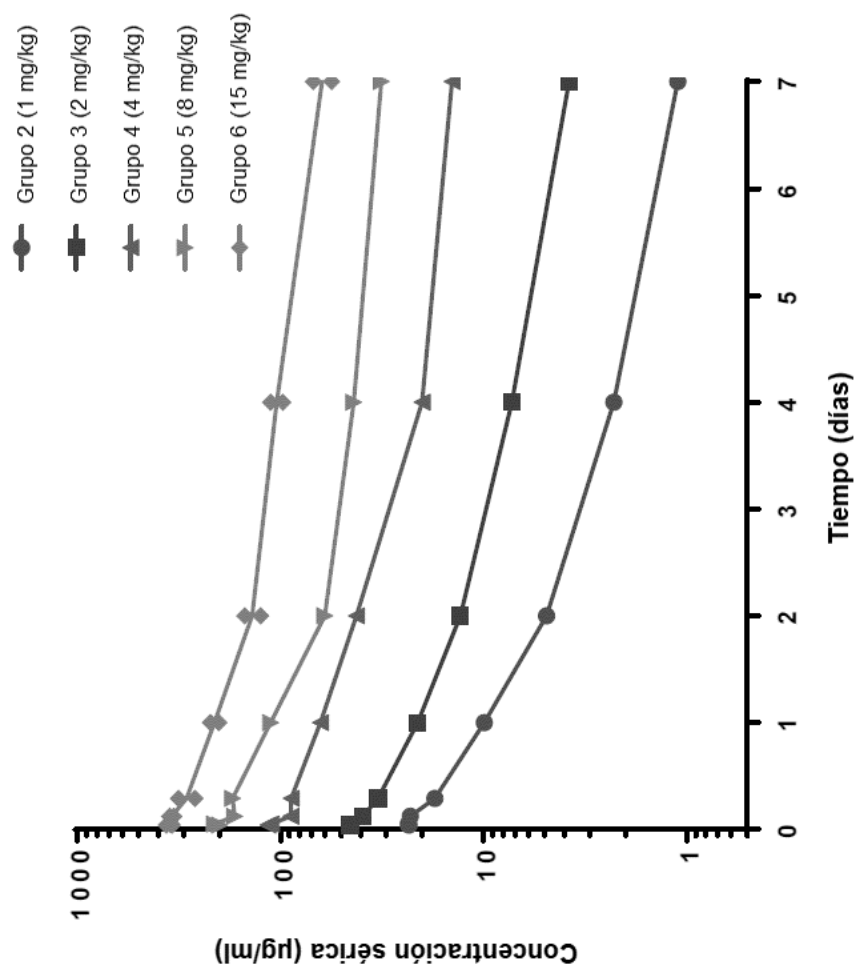


Figura 20B

TDB	CL (ml/Kg/d)
gD/40G5c	6.0
gD/38E4.v1	19.7
CD20/40G5c	22.3
FcRh5/38E4.v1	33.6
CD79b/38E4.v1	28.5
cyCD79b/38E4.v1	50
HER2/40G5c*	13.4
<u>20A12.QNTv.12/38E4v1</u> <u>(1 mg/kg)*</u>	<u>25.9</u>
<u>20A12.QNTv.12/38E4v1</u> <u>(15 mg/kg)*</u>	<u>11.7</u>

* Los datos no se muestran en el gráfico

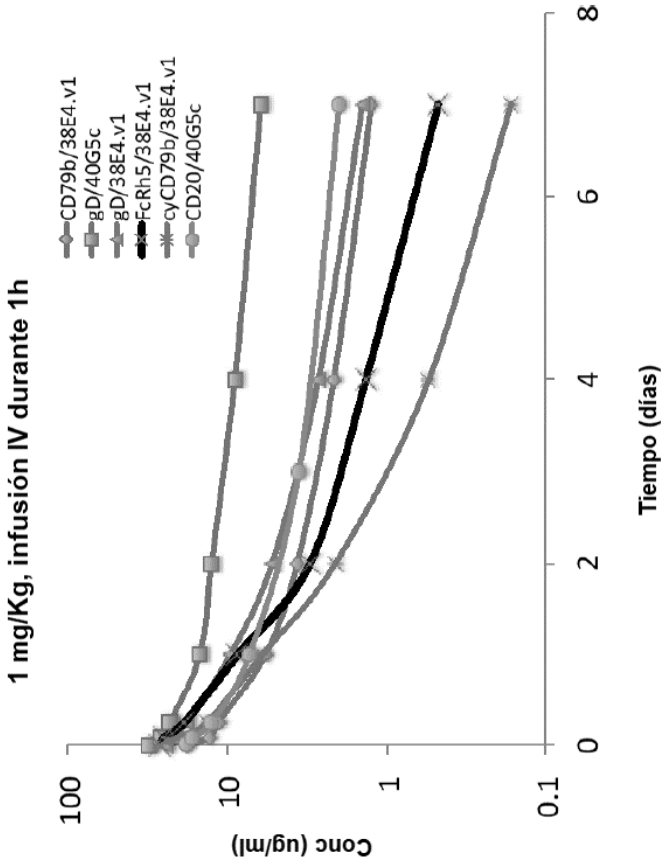


Figura 21

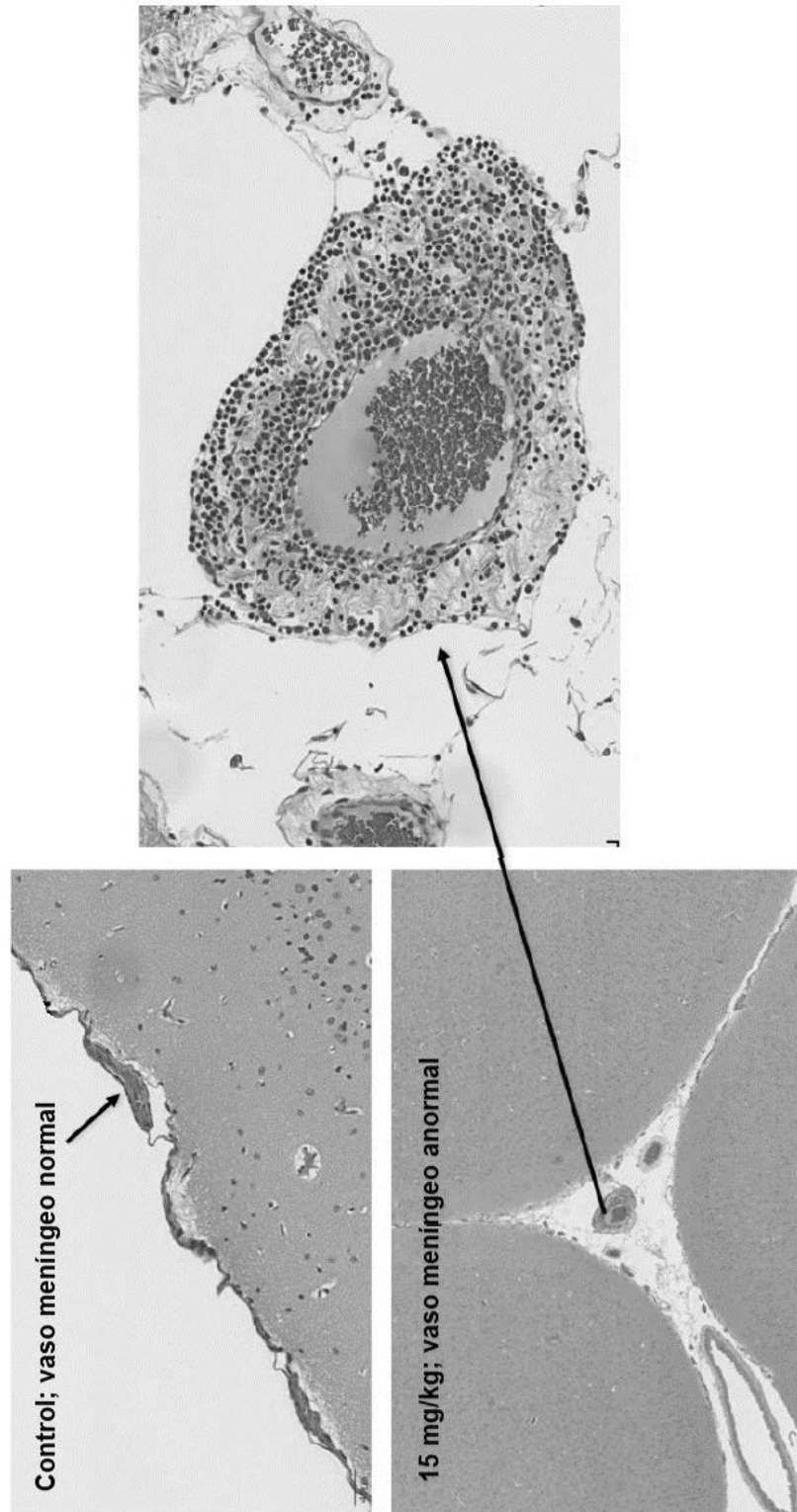


Figura 22A

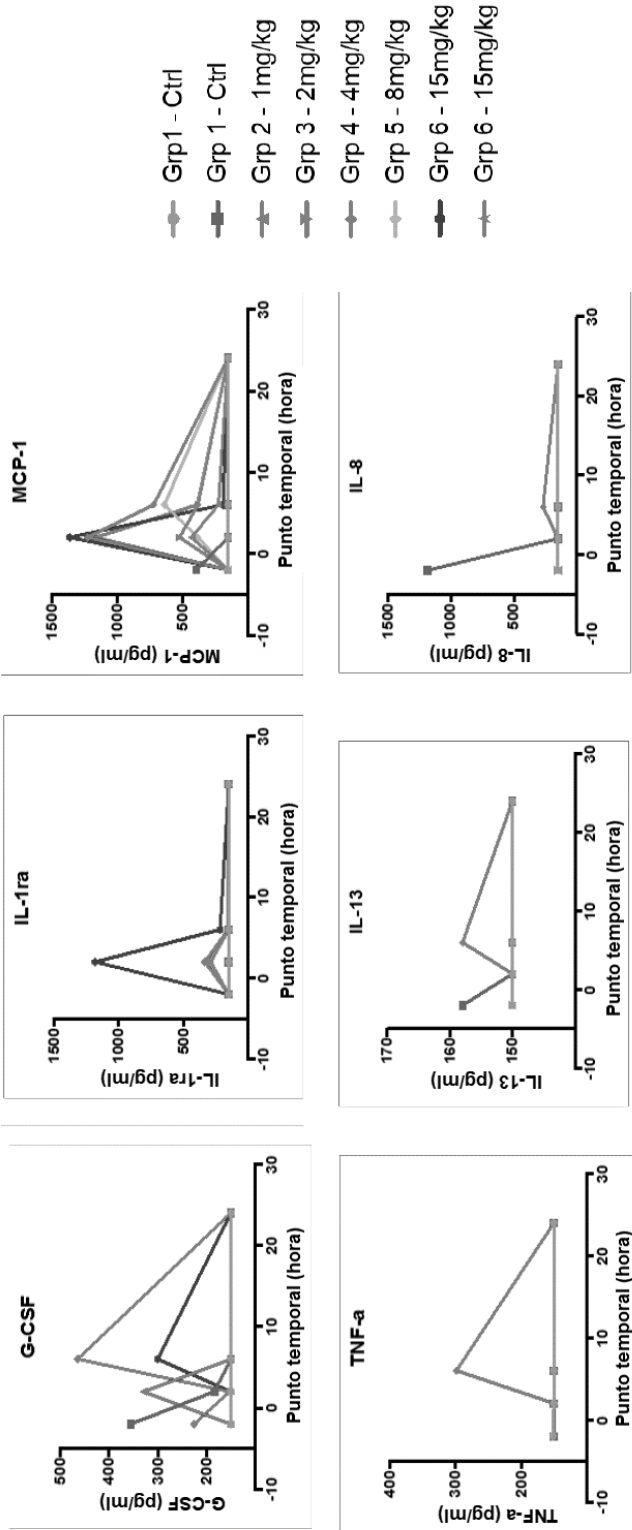


Figura 23A

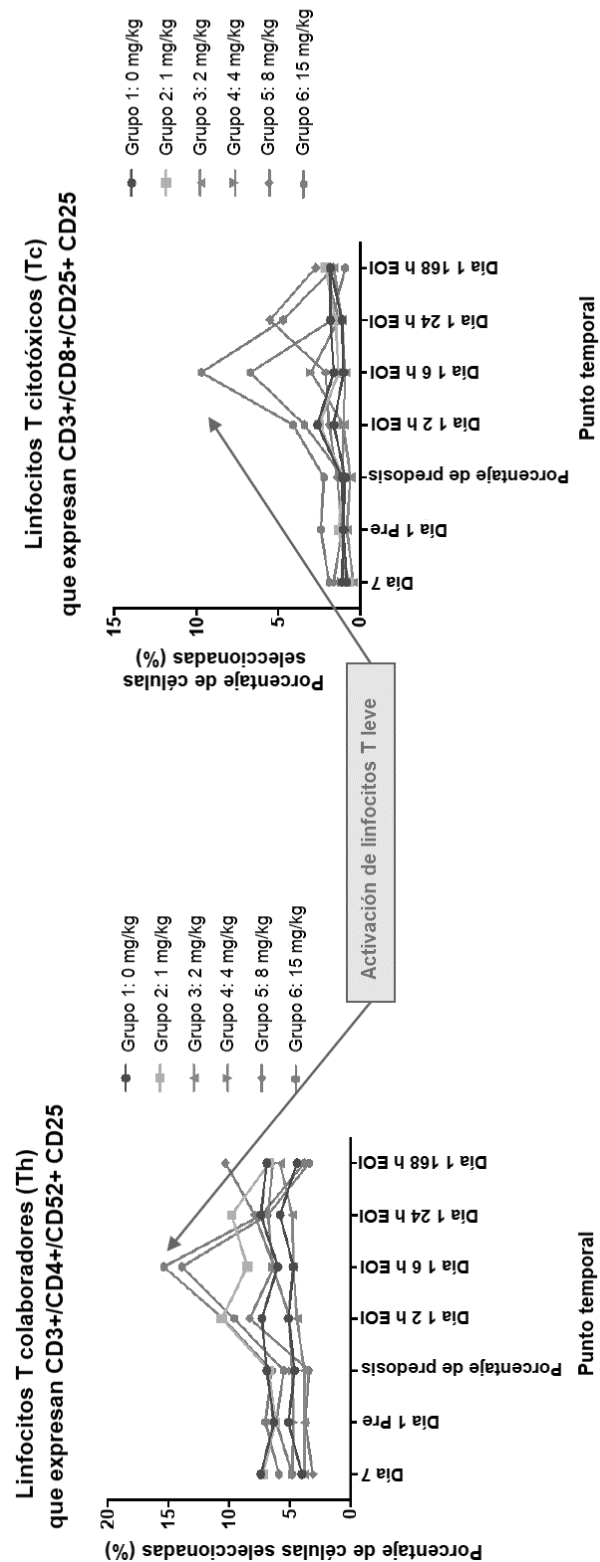


Figura 23B

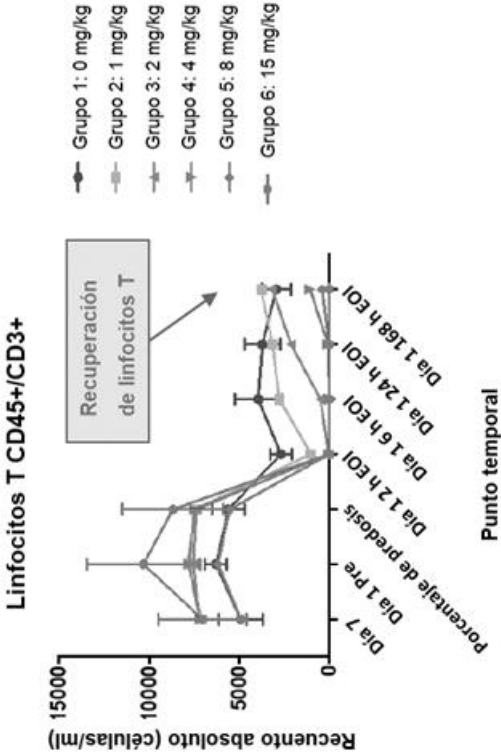


Figura 23C

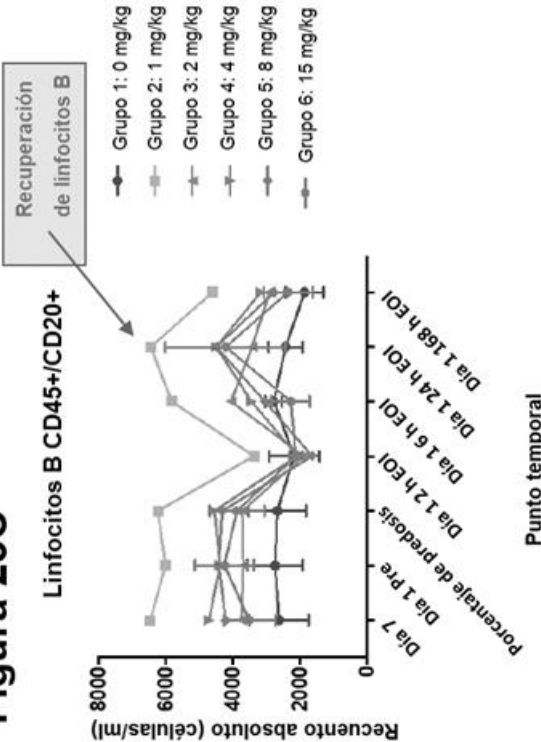


Figura 23D

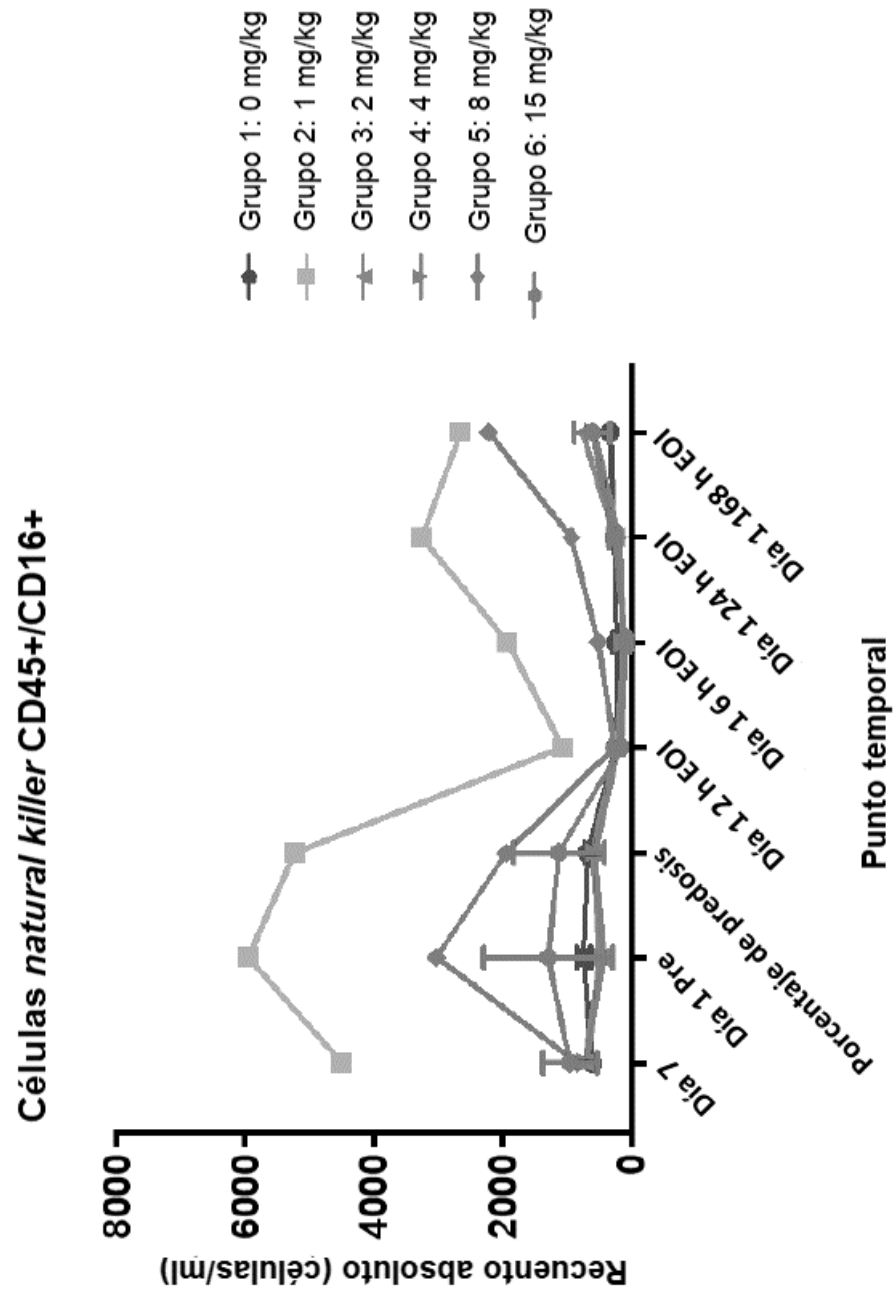
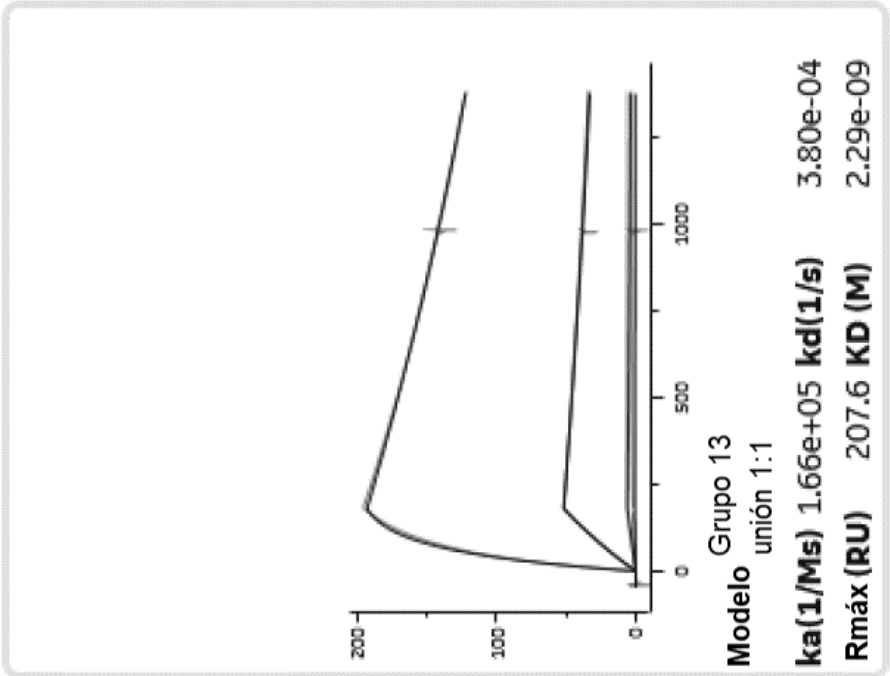


Figura 24A

Macaca fascicularis



humano

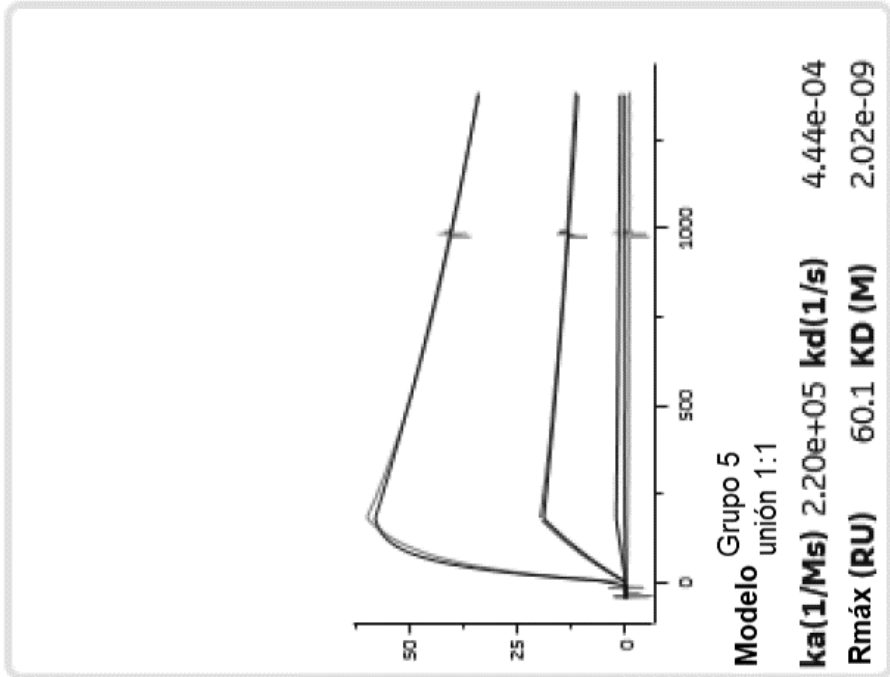


Figura 24B

humano

Macaca fascicularis

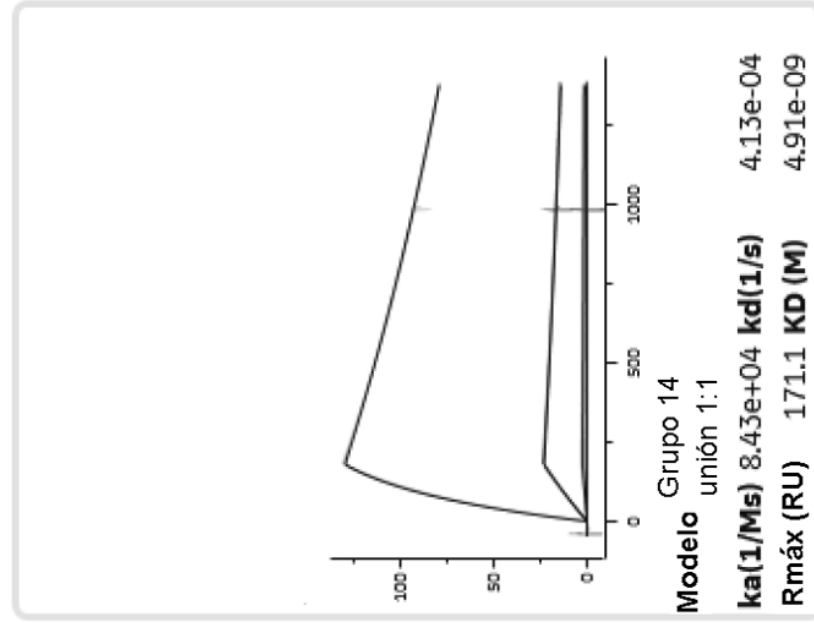
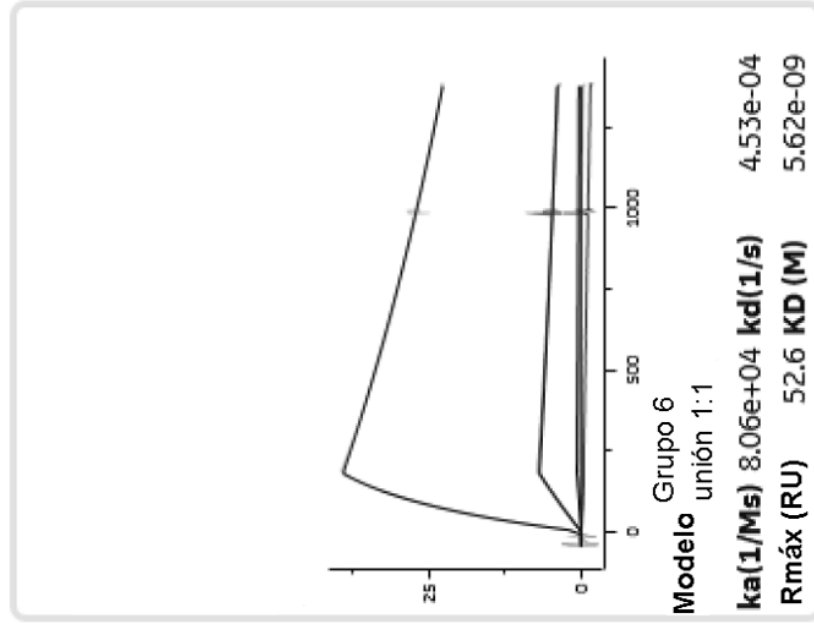


Figura 24C

humano

Macaca fascicularis

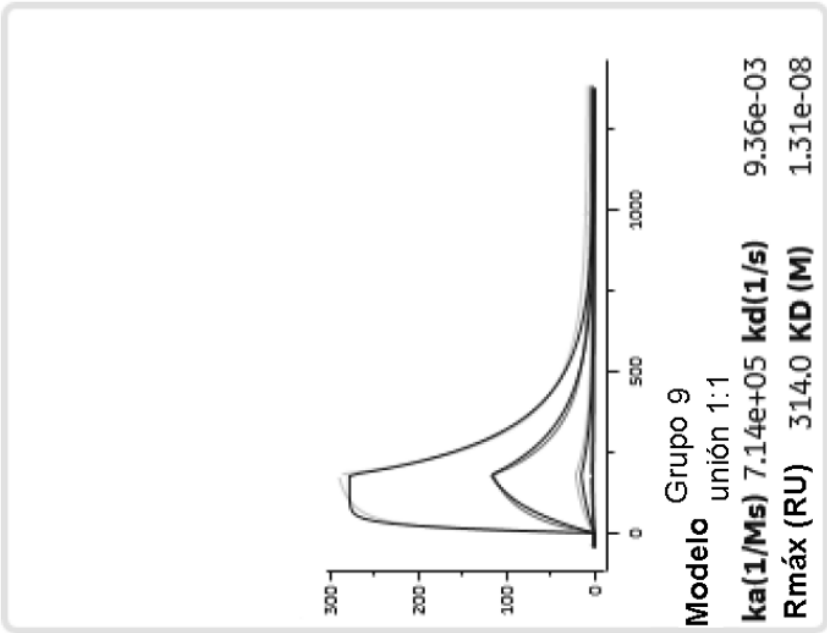
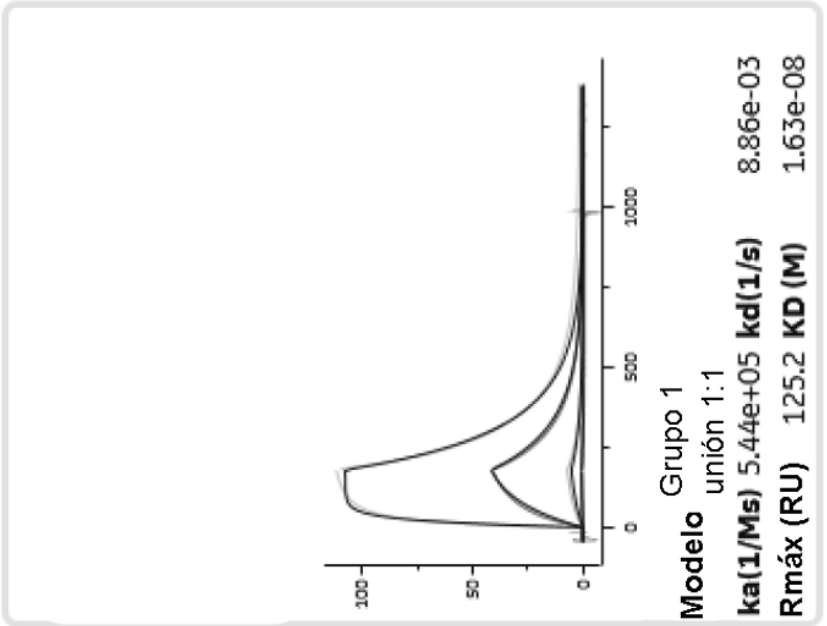


Figura 24D

humano

Macaca fascicularis

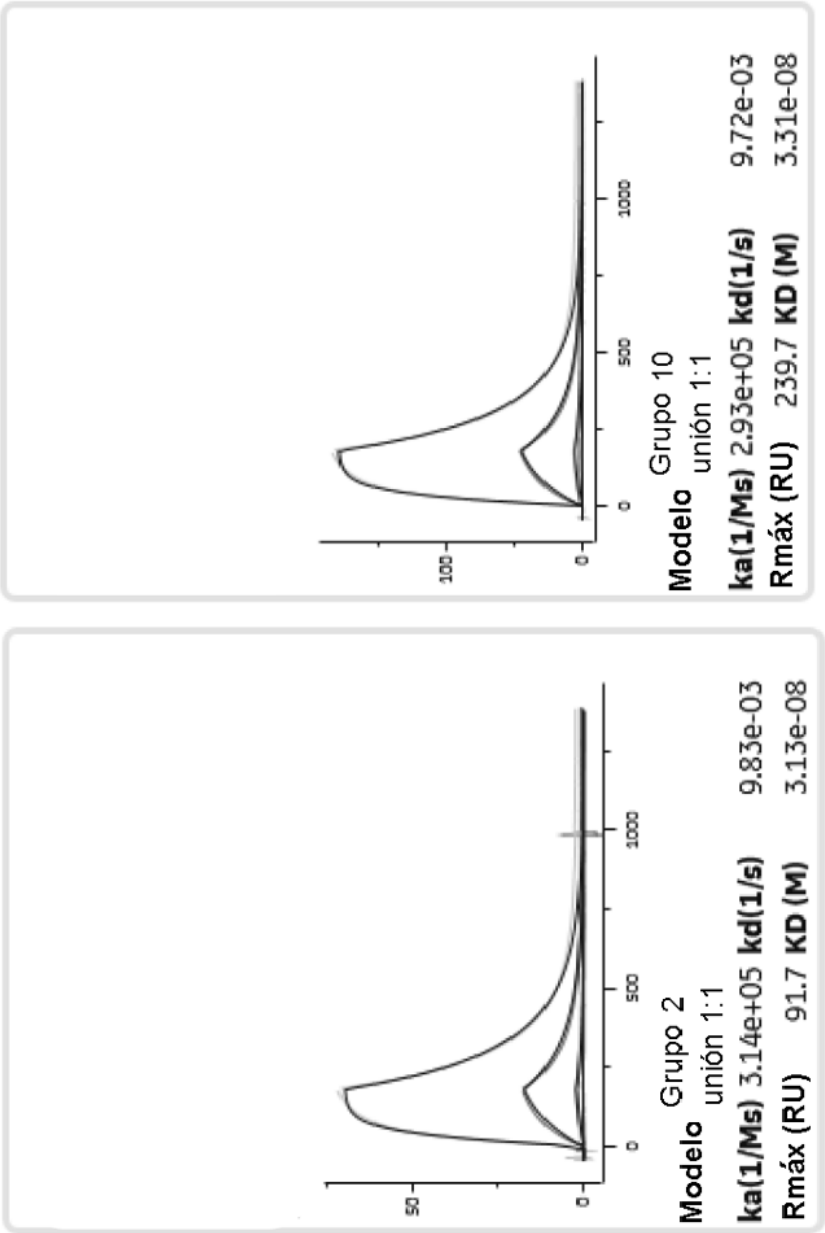
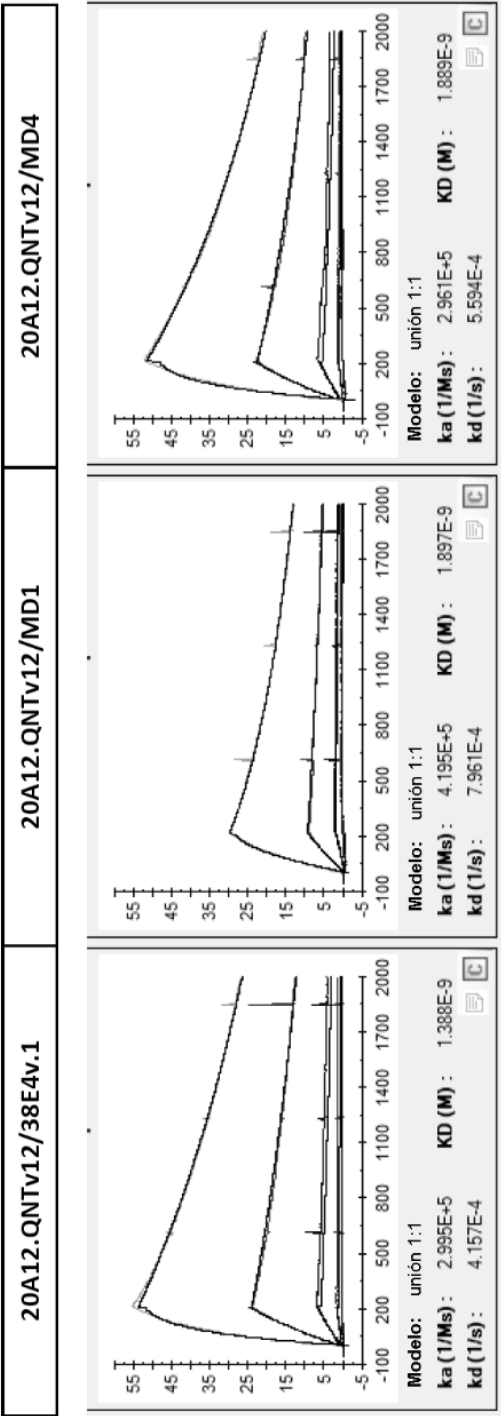


Figura 25



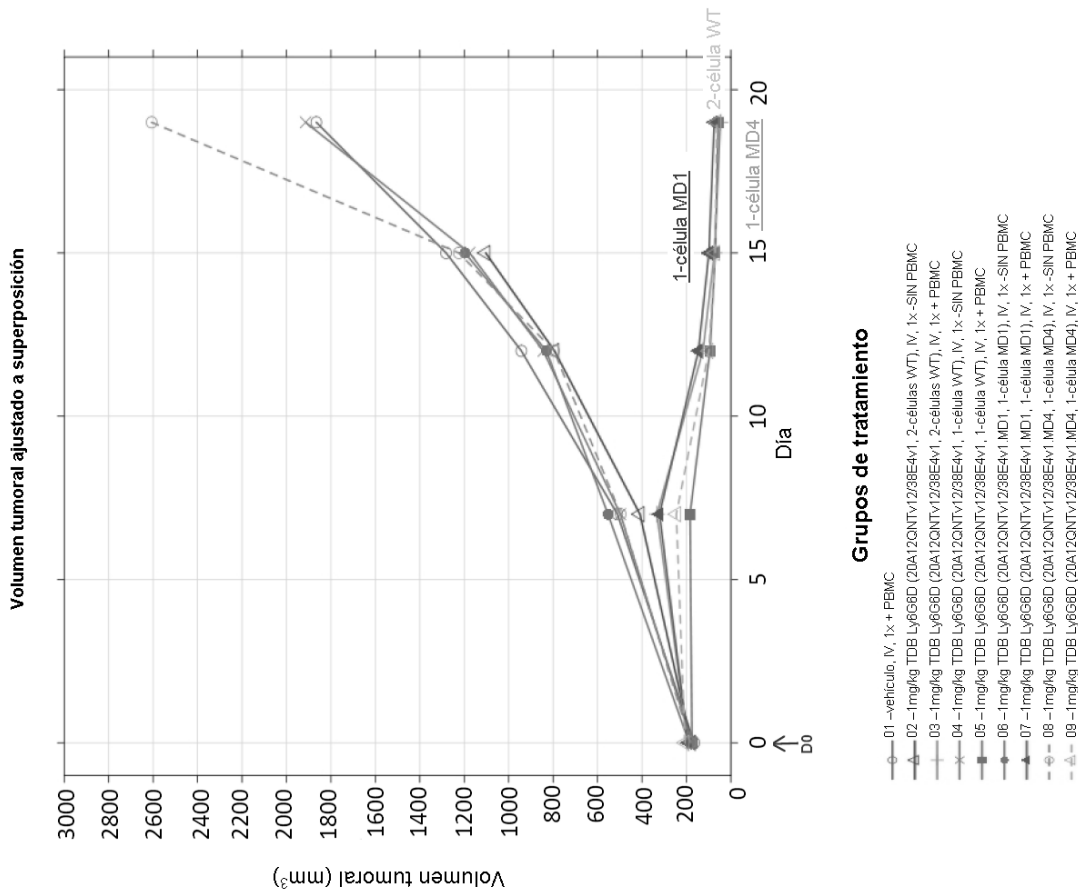


Figura 26A

Figura 26B

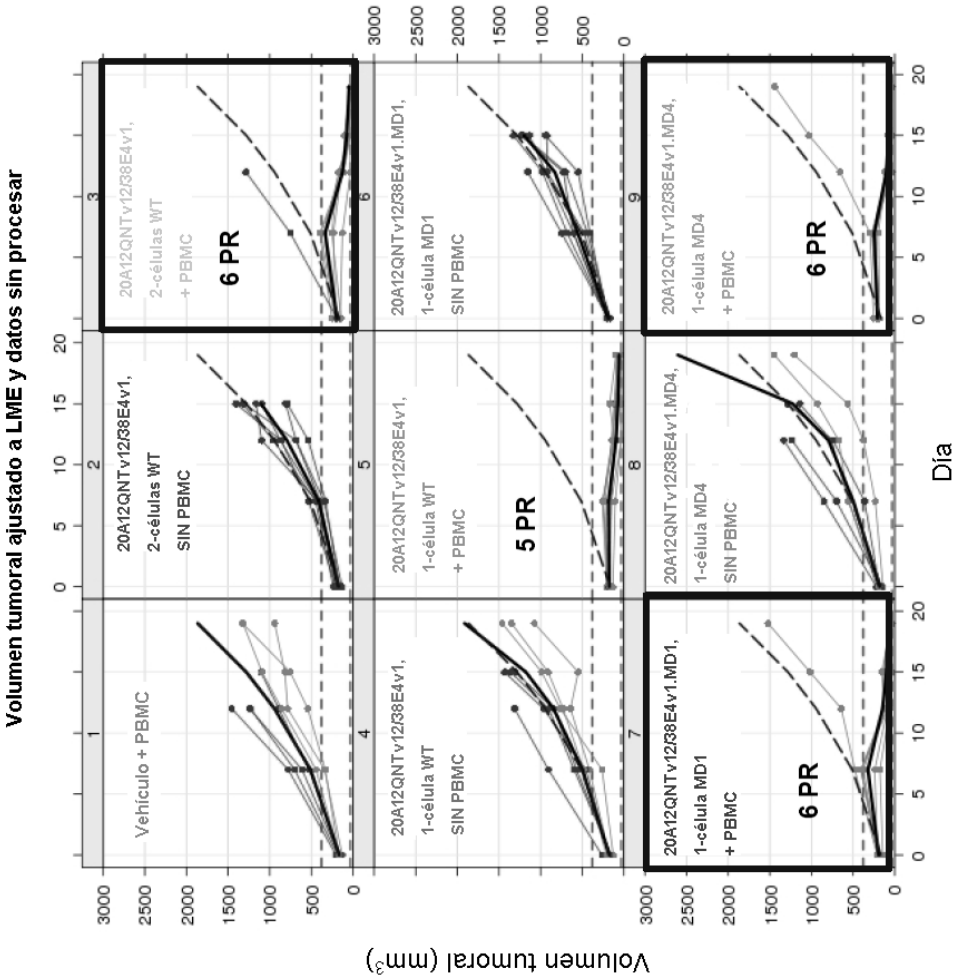
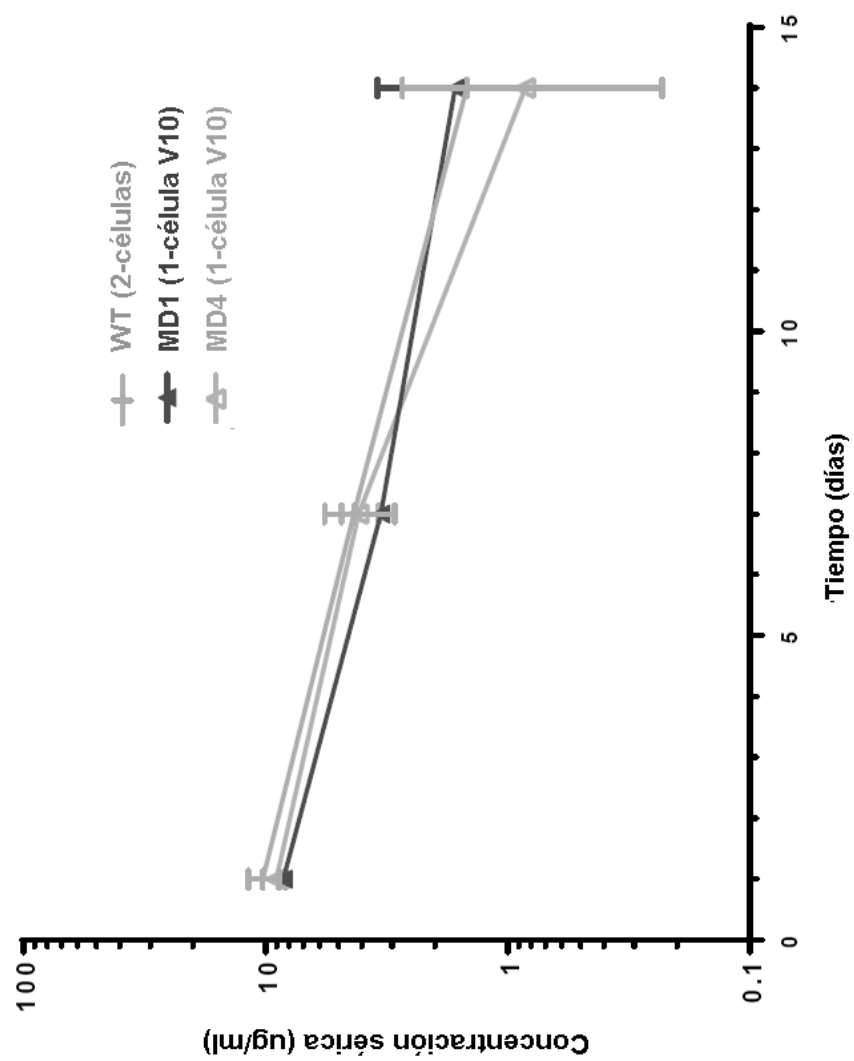


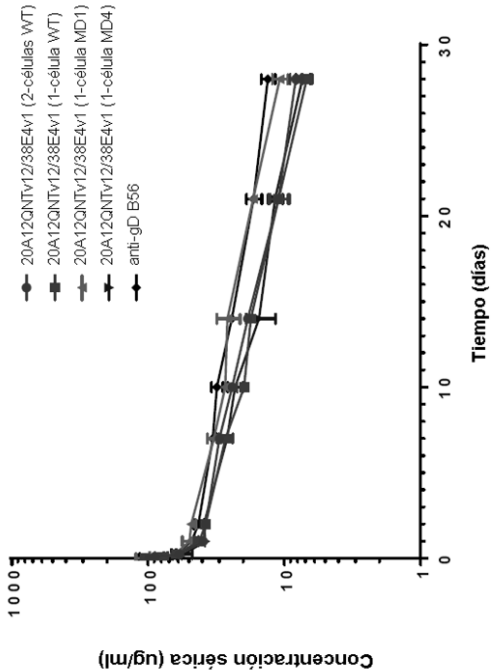
Figura 27

Perfiles PK en ratón NSG en modelo HT55



IVPK en TDB LY6G6D en ratón SCID a 5 mg/kg

Figura 28



Grupo #	Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC ₀₋₂₈ (µg/ml* día)	CL (ml/día/kg)	V _{ss} (ml/kg)	t _{1/2} (días)
1	20A12.QNTv12-38E4.v1 (2-células WT)	99.2	603	6.73	110	11.8
2	20A12.QNTv12-38E4.v1 (1-célula WT)	105	569	7.35	111	11.2
3	20A12.QNTv12-38E4.v1 (1-célula MD1)	107	760	5.23	92.0	12.5
4	20A12.QNTv12-38E4.v1 (1-célula MD4)	95.0	566	7.23	116	11.8
5	Anti-gD B56	103	756	4.81	102	14.9

Figura 29A

Región variable de la cadena liviana

		CDR L1 - Chothia		CDR L1 - Kabat		CDR L1 - Contacto								
Número de Kabat		CDR L1 - Chothia		CDR L1 - Kabat		CDR L1 - Contacto								
38E4v1	DI	VM	TQSPD	SL	AVSL	GERAT	INCKSSQ	SSL	LN	SR	TR	KN	YL	AWY
38E4v1.MD1	DI	VM	TQSPD	SL	AVSL	GERAT	INCKSSQ	SSL	LN	SR	TR	KN	YL	AWY
38E4v1.MD4	DI	VM	TQSPD	SL	AVSL	GERAT	INCKSSQ	SSL	LN	SR	TR	KN	YL	AWY
40G5c	DI	VM	TQSPD	SL	AVSL	GERAT	INCKSSQ	SSL	LN	SR	TR	KN	YL	AWY

		CDR L2 - Chothia		CDR L2 - Kabat		CDR L2 - Contacto																													
Número de Kabat		CDR L2 - Chothia		CDR L2 - Kabat		CDR L2 - Contacto																													
38E4v1	QQ	K	PGQ	SP	PK	LL	I	Y	W	T	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
38E4v1.MD1	QQ	K	PGQ	P	PK	LL	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
38E4v1.MD4	QQ	K	PGQ	P	PK	LL	I	Y	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
40G5c	QQ	K	PGQ	P	PK	LL	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L

		CDR L3 - Chothia		CDR L3 - Kabat		CDR L3 - Contacto																								
Número de Kabat		CDR L3 - Chothia		CDR L3 - Kabat		CDR L3 - Contacto																								
38E4v1	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	K	Q	S	F	I	L	-	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO: 93
38E4v1.MD1	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	T	Q	S	F	I	L	-	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO: 53
38E4v1.MD4	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	K	Q	S	F	I	L	-	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO: 94
40G5c	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	T	Q	S	F	I	L	-	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO: 53

Figura 29B

Región variable de la cadena pesada

		CDR H1 - Contacto	
		CDR H1 - Chothia	CDR H1 - Kabat
Número de Kabat			
38E4v1	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F T F T S Y Y I H W V R Q A P G		
38E4v1MD1	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F T F T S Y Y I H W V R Q A P G		
38E4v1MD4	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G F T F T S Y Y I H W V R Q A P G		
40G5c	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y I H W V R Q A P G		
		CDR H2 - Contacto	
		CDR H2 - Chothia	CDR H2 - Kabat
Número de Kabat			
38E4v1	Q G L E W I G W I Y P E N D N T K Y N E K F K D R V T I T A D T S T S T A Y L E L S		
38E4v1MD1	Q G L E W I G W I Y P E N D N T K Y N E K F K D R V T I T A D T S T S T A Y L E L S		
38E4v1MD4	Q G L E W I G W I Y P E N D N T K Y N E K F K D R V T I T A D T S T S T A Y L E L S		
40G5c	Q G L E W I G W I Y P G D G N T K Y N E K F K G R A T L T A D T S T S T A Y L E L S		
		CDR H3 - Contacto	
		CDR H3 - Chothia	CDR H3 - Kabat
Número de Kabat			
38E4v1	S L R S E D T A V Y Y C A R D G Y S R Y Y F D Y W G Q G T L V T V S S		
38E4v1MD1	S L R S E D T A V Y Y C A R D G Y S R Y Y F D Y W G Q G T L V T V S S		
38E4v1MD4	S L R S E D T A V Y Y C A R D G Y S R Y Y F D Y W G Q G T L V T V S S		
40G5c	S L R S E D T A V Y Y C A R D S Y S N Y Y F D Y W G Q G T L V T V S S		

SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 98

Figura 29C

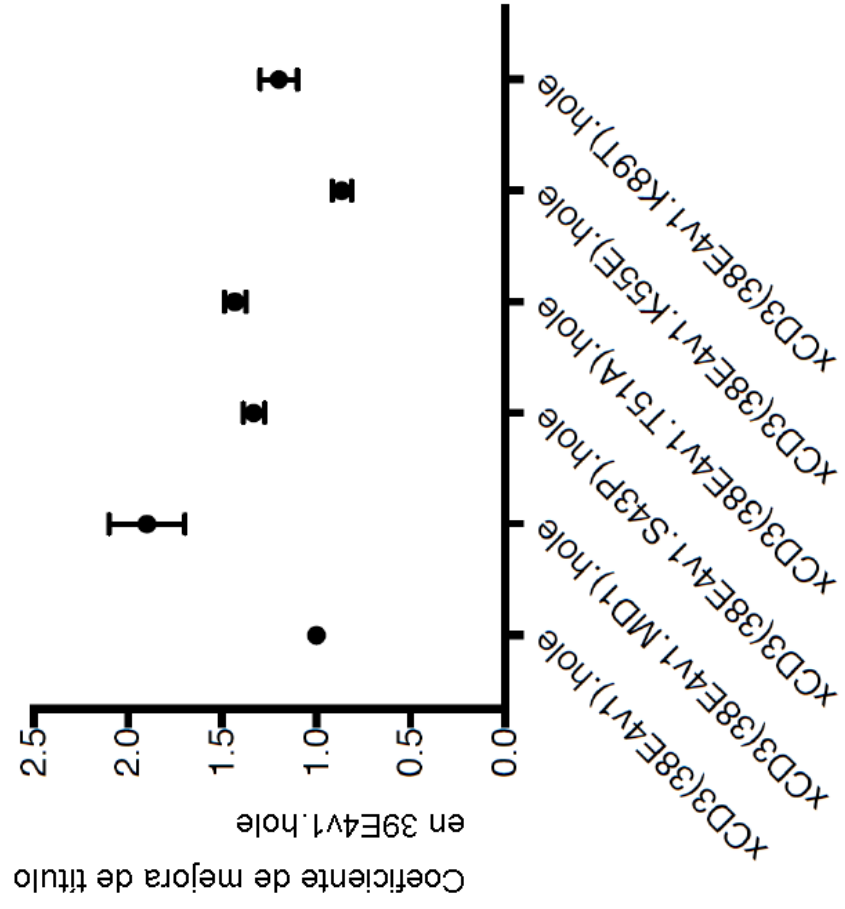


Figura 29D

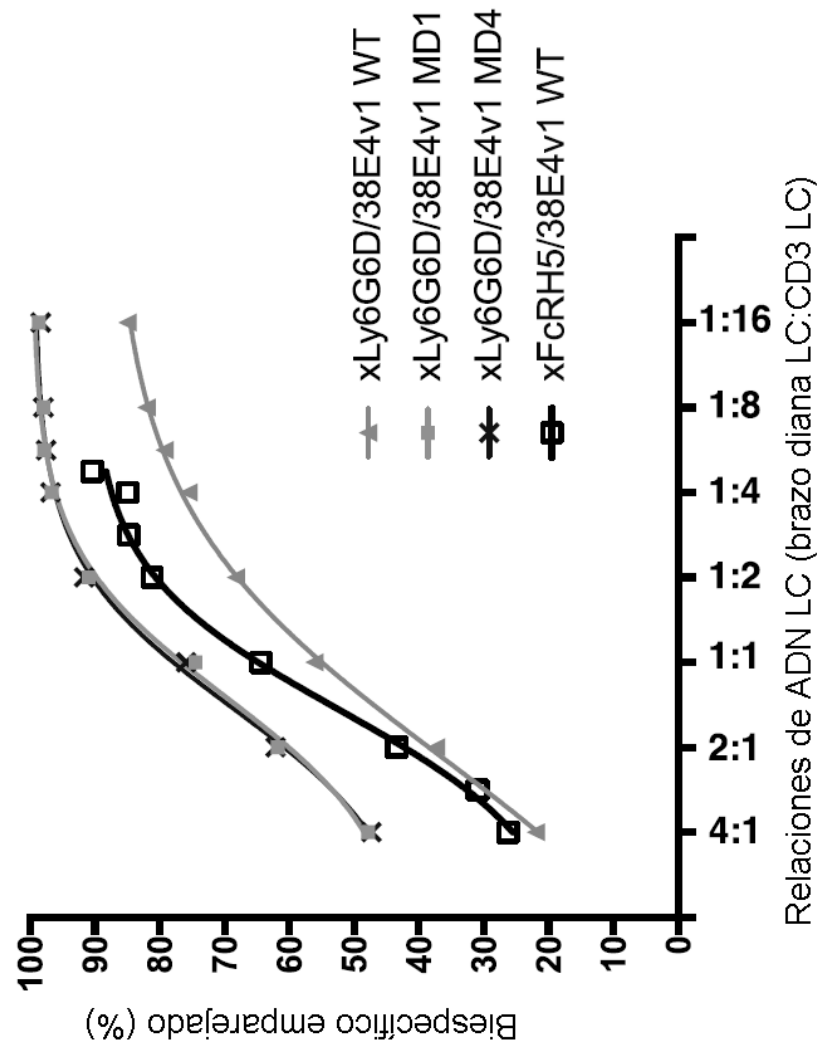


Figura 29E

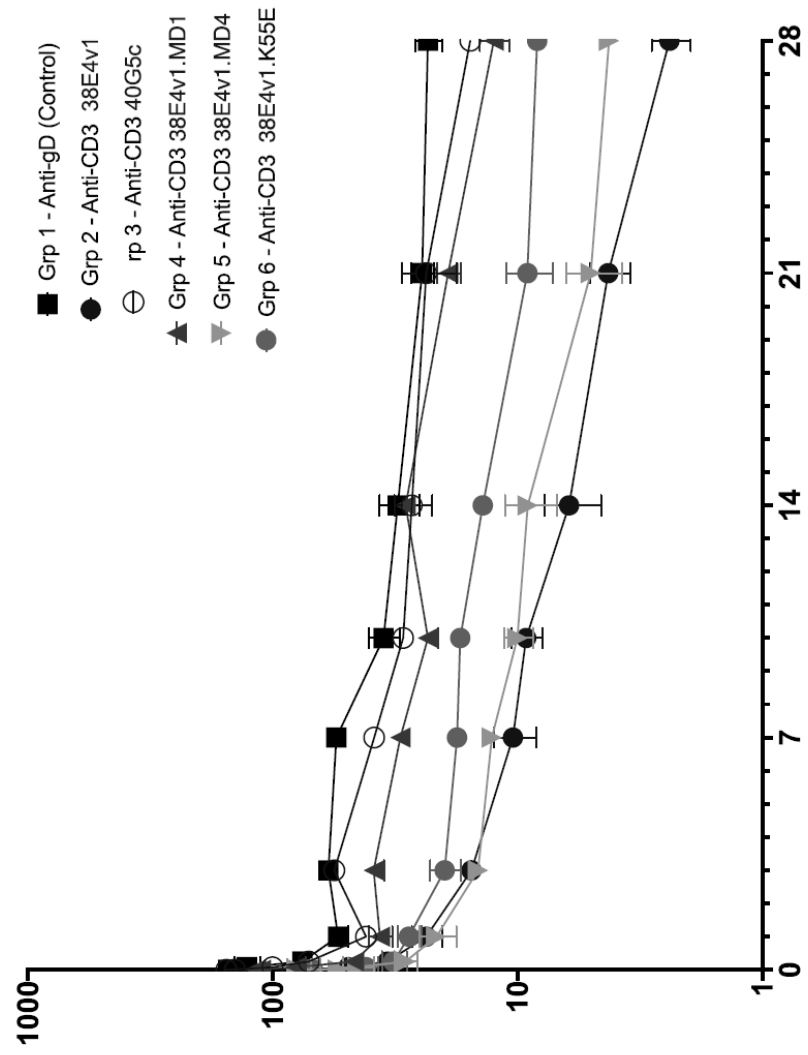


Figura 29F

CDR L1 - Contacto	
CDR L1 - Chothia	
CDR L1 - Kabat	
Número de Kabat	36 35 34 33 32 31 30 29 28 27f 27e 27d 27c 27b 27a 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
38E4v1	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S R T R K N Y L A W Y
38E4v1MD1	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S R T R K N Y L A W Y
38E4v1MD4	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S R T R K N Y L A W Y
40G5c	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L L N S R T R K N Y L A W Y

CDR L2 - Contacto	
CDR L2 - Chothia	
CDR L2 - Kabat	
Número de Kabat	78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52 51 50 49 48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37
38E4v1	Q E K P G Q S P K L L I Y W T S T R K S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L
38E4v1MD1	Q E K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L
38E4v1MD4	Q E K P G Q S P K L L I Y W A S T R K S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L
40G5c	Q E K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L

CDR L3 - Contacto	
CDR L3 - Chothia	
CDR L3 - Kabat	
Número de Kabat	107 106 105 104 103 102 101 100 99 98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88 87 86 85 84 83 82 81 80 79
38E4v1	Q A E D V A V Y Y C K Q S F I L - R T F G Q G T K V E I K S E Q I D N O : 108
38E4v1MD1	Q A E D V A V Y Y C T Q S F I L - R T F G Q G T K V E I K S E Q I D N O : 21
38E4v1MD4	Q A E D V A V Y Y C K Q S F I L - R T F G Q G T K V E I K S E Q I D N O : 55
40G5c	Q A E D V A V Y Y C T Q S F I L - R T F G Q G T K V E I K S E Q I D N O : 21

Figura 29G

		CDR H1 - Contacto		CDR H1 - Chothia		CDR H1 - Kabat																																					
Número de Kabat																																											
38E4v1	1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	T	F	T	S	Y	I	H	W	V	R	K	A	P	G	
38E4v1MD1	2	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	T	F	T	S	Y	I	H	W	V	R	K	A	P	G	
38E4v1MD4	3	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	T	F	T	S	Y	I	H	W	V	R	K	A	P	G	
40G5c	4	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	T	F	T	S	Y	I	H	W	V	R	K	A	P	G	
		CDR H2 - Contacto		CDR H2 - Chothia		CDR H2 - Kabat																																					
Número de Kabat																																											
38E4v1	5	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	E	N	D	N	T	K	Y	N	E	K	F	K	D	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S
38E4v1MD1	6	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	E	N	D	N	T	K	Y	N	E	K	F	K	D	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S
38E4v1MD4	7	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	E	N	D	N	T	K	Y	N	E	K	F	K	D	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S
40G5c	8	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	D	G	N	T	K	Y	N	E	K	F	K	G	R	A	T	L	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S
		CDR H3 - Contacto		CDR H3 - Chothia		CDR H3 - Kabat																																					
Número de Kabat																																											
38E4v1	9	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	D	G	Y	S	R	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	E	Q	I	D	N	O	: 20
38E4v1MD1	10	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	D	G	Y	S	R	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	E	Q	I	D	N	O	: 20
38E4v1MD4	11	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	D	G	Y	S	R	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	E	Q	I	D	N	O	: 20
40G5c	12	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	D	S	Y	S	N	Y	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	E	Q	I	D	N	O	: 109

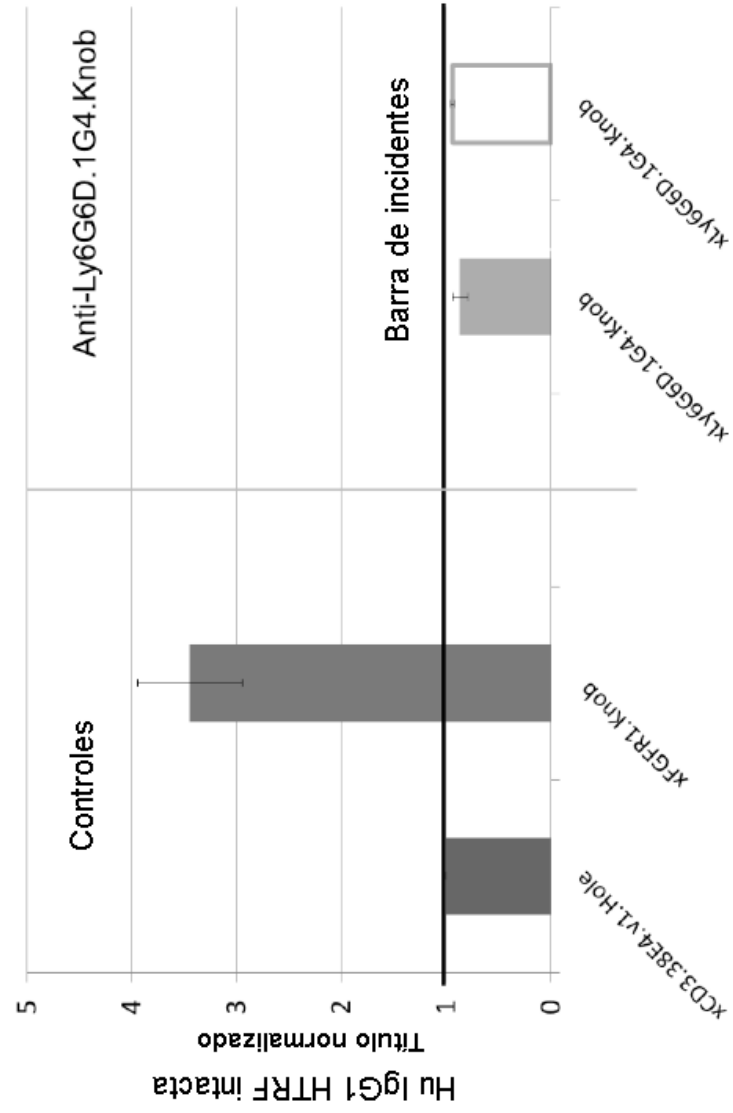
Figura 30

Figura 31A

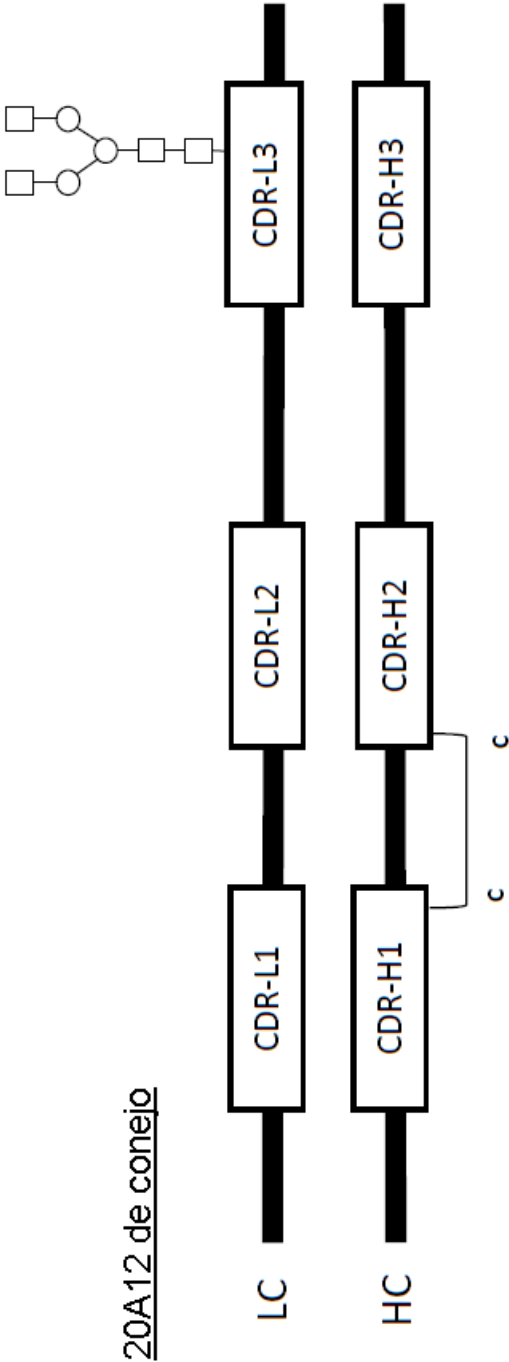


Figura 31B

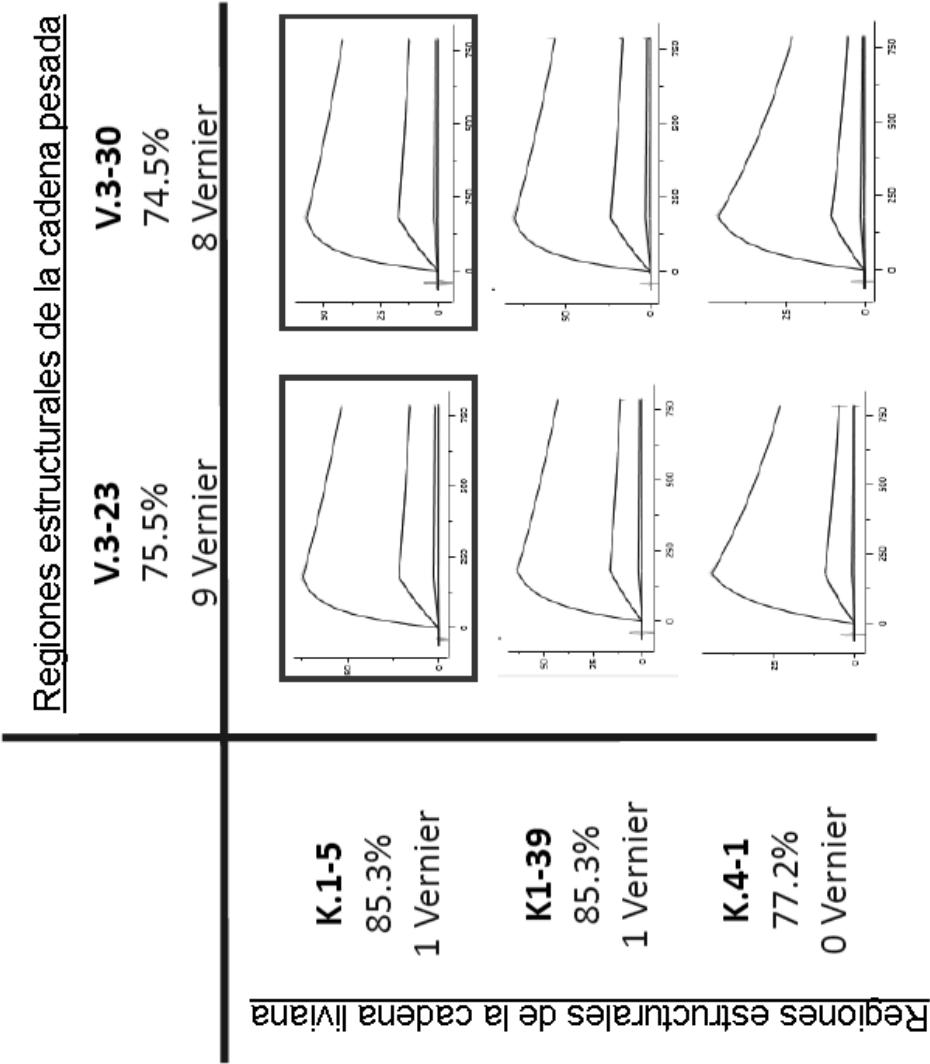


Figura 31C

ID	Línea germinal VL humana	Posiciones de Vernier	Carga parcial: Vernier no humano	Identidad humana Bala	Carga parcial: Vernier completamente humano	Identidad humana: Alta	Prevalencia en repertorio
1	hIGKV1D-39*01	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	13.3%
2	hIGKV1-39*01	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	12.7%
3	hIGKV1-5*01	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	4.7%
4	hIGKV1-5*02	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	4.7%
5	hIGKV1D-33*01	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	3.1%
6	hIGKV1-33*01	1	3.8	85.3%	3.8	86.3%	1.6%
7	hIGKV1-5*03	1	3.8	84.2%	3.8	85.3%	4.7%
8	hIGKV1-9*01	2	3.8	83.2%	3.8	85.3%	2.2%
9	hIGKV1-27*01	1	3.8	83.2%	3.8	84.2%	1.8%
10	hIGKV1-8*01	1	5.8	83.2%	5.8	84.2%	0.7%
11	hIGKV1-12*01	1	3.8	82.1%	3.8	83.2%	1.7%
12	hIGKV1-12*02	1	3.8	82.1%	3.8	83.2%	1.7%
13	hIGKV1D-12*01	1	3.8	82.1%	3.8	83.2%	1.6%
14	hIGKV1D-12*02	1	3.8	82.1%	3.8	83.2%	1.6%
15	hIGKV1-16*01	3	3.8	82.1%	3.8	85.3%	1.3%
16	hIGKV1-16*02	3	3.8	82.1%	3.8	85.3%	1.3%
17	hIGKV1-6*01	1	4.8	82.1%	4.8	83.2%	0.9%
18	hIGKV1-6*02	1	4.8	82.1%	4.8	83.2%	0.9%
19	hIGKV3-11*01	3	2.0	81.1%	2.0	84.2%	8.0%
20	hIGKV1-17*01	2	3.8	81.1%	4.8	83.2%	1.1%
21	hIGKV1-17*02	2	3.8	81.1%	4.8	83.2%	1.1%
22	hIGKV1-17*03	3	3.8	81.1%	4.8	84.2%	1.1%
23	hIGKV3-11*02	4	2.0	80.0%	3.0	84.2%	8.0%
24	hIGKV3-15*01	2	2.9	78.9%	2.9	81.1%	6.3%
25	hIGKV3-20*01	3	2.0	78.1%	2.0	81.3%	21.8%
26	hIGKV4-1*01	0	0.8	77.2%	0.8	77.2%	4.9%
27	hIGKV2D-29*01	0	1.8	76.0%	1.8	76.0%	2.0%
28	hIGKV2D-28*01	1	0.9	75.0%	0.9	76.0%	2.5%
29	hIGKV2-28*01	1	0.9	75.0%	0.9	76.0%	2.0%
30	hIGKV2D-29*02	1	1.8	75.0%	1.8	76.0%	2.0%
31	hIGKV2-24*01	1	2.8	75.0%	2.8	76.0%	0.9%
32	hIGKV2-30*01	4	2.8	73.0%	3.8	77.0%	2.0%
33	hIGKV2-30*02	4	2.8	73.0%	3.8	77.0%	2.0%

Figura 31D

ID	Línea germinal VH humana	Posiciones de Vernier	Carga parcial: Vernier no humano	Identidad humana Baja	Carga parcial: Vernier completamente humano	Identidad humana Alta	Prevalencia en repertorio
1	hIGHV3-23*01	9	-0.2	75.5%	0.8	82.7%	7.6%
2	hIGHV3-23*04	9	-0.2	75.5%	0.8	82.7%	7.6%
3	hIGHV3-23*02	9	-0.2	74.5%	0.8	81.6%	7.6%
4	hIGHV3-30*01	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
5	hIGHV3-30*04	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
6	hIGHV3-30*07	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
7	hIGHV3-30*09	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
8	hIGHV3-30*11	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
9	hIGHV3-30*14	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
10	hIGHV3-30*15	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
11	hIGHV3-30*16	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
12	hIGHV3-30*17	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	6.6%
13	hIGHV3-48*01	9	-0.2	74.5%	0.8	81.6%	2.4%
14	hIGHV3-48*02	9	-1.2	74.5%	-0.2	81.6%	2.4%
15	hIGHV3-48*03	9	-0.2	74.5%	0.8	81.6%	2.4%
16	hIGHV3-30-3*01	8	0.8	74.5%	1.8	80.6%	2.1%
17	hIGHV3-64*01	10	-0.2	74.5%	0.8	82.7%	0.7%
18	hIGHV3-64*02	10	-1.1	74.5%	-0.1	82.7%	0.7%
19	hIGHV3-23*03	9	-0.2	73.5%	0.8	80.6%	7.6%
20	hIGHV3-30*03	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
21	hIGHV3-30*05	8	1.8	73.5%	2.8	79.6%	6.6%
22	hIGHV3-30*06	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
23	hIGHV3-30*08	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
24	hIGHV3-30*10	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
25	hIGHV3-30*12	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
26	hIGHV3-30*13	8	1.8	73.5%	2.8	79.6%	6.6%
27	hIGHV3-30*19	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	6.6%
28	hIGHV3-7*01	8	-0.2	73.5%	0.8	79.6%	3.5%
29	hIGHV3-33*02	8	-0.2	73.5%	0.8	79.6%	2.8%
30	hIGHV3-33*05	8	0.8	73.5%	1.8	79.6%	2.8%
31	hIGHV3-21*01	9	0.8	73.5%	1.8	80.6%	2.4%
32	hIGHV3-21*02	9	0.8	73.5%	1.8	80.6%	2.4%
33	hIGHV3-11*01	10	0.8	73.5%	1.8	81.6%	2.1%

Figura 32A

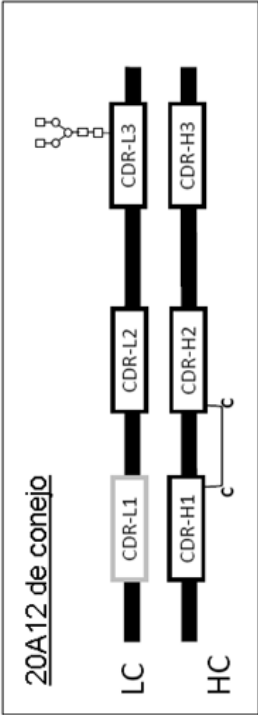


Figura 32B

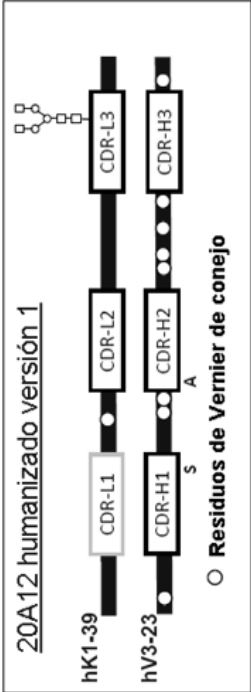


Figura 32C

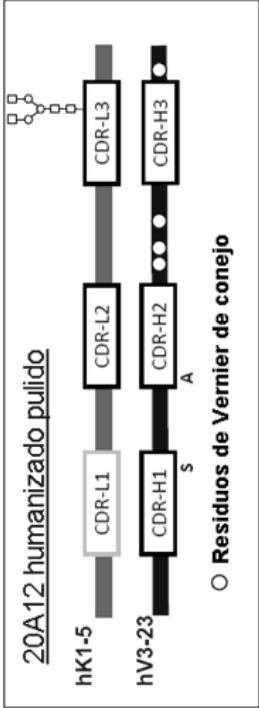


Figura 32D

	Variante humanizada/de conejo	KD (nM)
rb.20A12		0.122
rb.20A12.SA		0.705
L1H1	Vernier completamente de conejo	2.447
L1H2	H: Q2V	1.585
L1H3	H: I48V	0.963
L1H4	H: A49S	1.377
L1H5	H: K71R	1.824
L1H6	H: S73N	2.241
L1H7	H: V78L	3.262
L1H8	H: F91Y	1.749
L1H9	H: P105R	2.014
L1H10	H: Vernier completamente humano	2.792
L2H1	L: P43A	2.456
L2H10	Vernier completamente humano	2.450

Figura 33A

ID	Línea germinal VL humana	Posiciones de Vernier	Carga parcial: Vernier no humano	Identidad humana Baja	Carga parcial: Vernier completamente humano	Identidad humana Alta	Prevalencia en repertorio
1	hIGKV3-20*01	4	0.5	78.4%	-0.5	82.5%	21.8%
2	hIGKV1-5*01	4	2.3	78.4%	1.3	82.5%	4.7%
3	hIGKV1-5*02	4	2.3	78.4%	1.3	82.5%	4.7%
4	hIGKV1-5*03	4	2.3	78.4%	1.3	82.5%	4.7%
5	hIGKV1-9*01	3	2.4	78.4%	1.4	81.4%	2.2%
6	hIGKV1-27*01	4	2.3	78.4%	1.3	82.5%	1.8%
7	hIGKV4-1*01	4	-0.6	78.2%	-1.6	82.2%	4.9%
8	hIGKV1D-39*01	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	13.3%
9	hIGKV1-39*01	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	12.7%
10	hIGKV3-15*01	5	1.4	77.3%	0.4	82.5%	6.3%
11	hIGKV1-12*01	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.7%
12	hIGKV1-12*02	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.7%
13	hIGKV1D-12*01	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.6%
14	hIGKV1D-12*02	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.6%
15	hIGKV1-16*01	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.3%
16	hIGKV1-16*02	4	2.3	77.3%	1.3	81.4%	1.3%
17	hIGKV1-17*03	4	2.4	77.3%	2.4	81.4%	1.1%
18	hIGKV1-8*01	4	4.3	77.3%	3.3	81.4%	0.7%
19	hIGKV3-11*01	4	0.4	76.3%	-0.6	80.4%	8.0%
20	hIGKV1-6*01	4	3.3	76.3%	2.3	80.4%	0.9%
21	hIGKV1-6*02	4	3.3	76.3%	2.3	80.4%	0.9%
22	hIGKV3-11*02	5	0.4	75.3%	0.4	80.4%	8.0%
23	hIGKV1D-33*01	4	2.3	75.3%	1.3	79.4%	3.1%
24	hIGKV1-33*01	4	2.3	75.3%	1.3	79.4%	1.6%
25	hIGKV1-17*01	5	2.4	75.3%	2.4	80.4%	1.1%
26	hIGKV1-17*02	5	2.4	75.3%	2.4	80.4%	1.1%
27	hIGKV2D-28*01	4	-0.6	74.0%	-1.6	78.0%	2.5%
28	hIGKV2-28*01	4	-0.6	74.0%	-1.6	78.0%	2.0%
29	hIGKV2-30*01	4	1.4	74.0%	1.4	78.0%	2.0%
30	hIGKV2-30*02	4	1.4	74.0%	1.4	78.0%	2.0%

Figura 33B

ID	Línea germinal VH humana	Posiciones de Vernier	Carga parcial: Vernier no humano	Identidad humana Baja	Carga parcial: Vernier completamente humano	Identidad humana Alta	Prevalencia en repertorio
1	hIGHV3-53*01	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	1.1%
2	hIGHV3-53*02	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	1.1%
3	hIGHV3-53*03	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	1.1%
4	hIGHV3-53*04	10	3.3	74.5%	4.3	82.7%	1.1%
5	hIGHV3-66*01	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	0.8%
6	hIGHV3-66*02	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	0.8%
7	hIGHV3-66*04	10	1.6	74.5%	2.6	82.7%	0.8%
8	hIGHV4-4*01	8	2.5	73.7%	3.5	79.8%	1.7%
9	hIGHV4-4*02	8	2.5	73.7%	3.5	79.8%	1.7%
10	hIGHV3-48*01	10	1.6	73.5%	2.6	81.6%	2.4%
11	hIGHV3-48*02	10	0.6	73.5%	1.6	81.6%	2.4%
12	hIGHV3-66*03	10	1.6	73.5%	2.6	81.6%	0.8%
13	hIGHV4-59*03	9	1.6	73.2%	1.6	80.4%	3.3%
14	hIGHV4-59*06	9	1.6	73.2%	1.6	80.4%	3.3%
15	hIGHV1-69*02	10	1.7	72.4%	2.7	80.6%	7.7%
16	hIGHV1-69*04	10	1.7	72.4%	2.7	80.6%	7.7%
17	hIGHV1-69*09	10	1.7	72.4%	2.7	80.6%	7.7%
18	hIGHV1-69*10	10	1.7	72.4%	2.7	80.6%	7.7%
19	hIGHV3-23*03	10	1.6	72.4%	2.6	80.6%	7.6%
20	hIGHV5-51*01	10	2.6	72.4%	3.6	80.6%	6.0%
21	hIGHV5-51*03	10	2.6	72.4%	3.6	80.6%	6.0%
22	hIGHV5-51*04	10	2.6	72.4%	3.6	80.6%	6.0%
23	hIGHV4-59*01	9	1.6	72.4%	1.6	79.6%	3.3%
24	hIGHV4-59*02	9	1.6	72.4%	1.6	79.6%	3.3%
25	hIGHV4-59*07	9	1.6	72.4%	1.6	79.6%	3.3%
26	hIGHV3-21*01	10	2.6	72.4%	3.6	80.6%	2.4%
27	hIGHV3-21*02	10	2.6	72.4%	3.6	80.6%	2.4%
28	hIGHV3-48*03	10	1.6	72.4%	2.6	80.6%	2.4%
29	hIGHV4-4*08	9	1.6	72.4%	1.6	79.6%	1.7%
30	hIGHV4-59*04	10	1.6	72.2%	1.6	80.4%	3.3%

Figura 34A

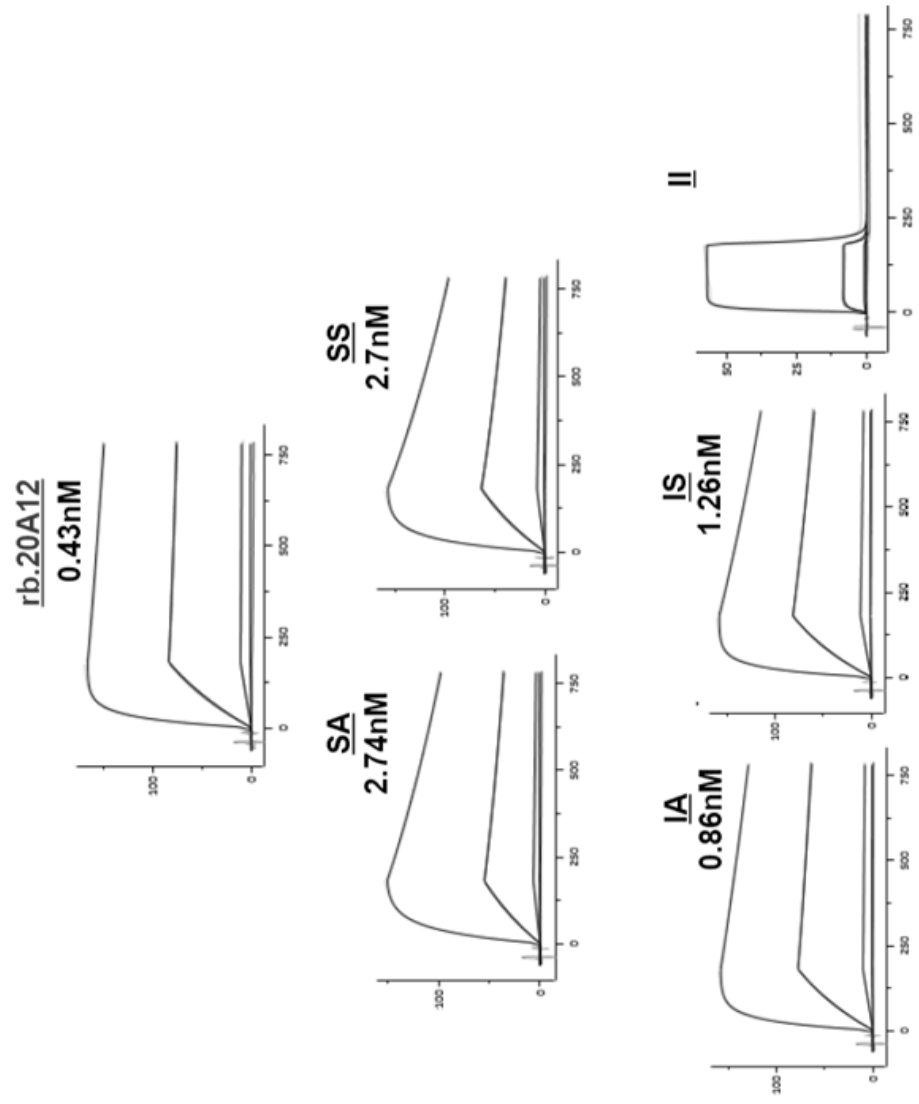
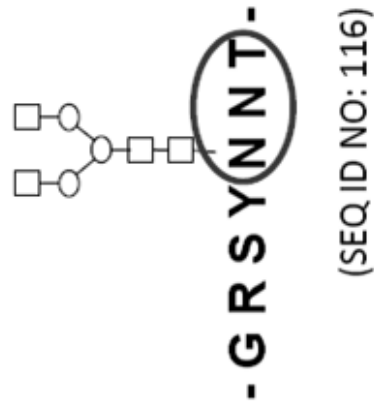


Figura 34B



Mutación	KD (nM)
NNT parental	0.43
QNT	0.28
QNV	0.22
SNT	0.25
SNA	0.27
ANT	0.26
NNA	0.26
NNV	0.22
GNT	0.34
SNV	0.23

Figura 34C

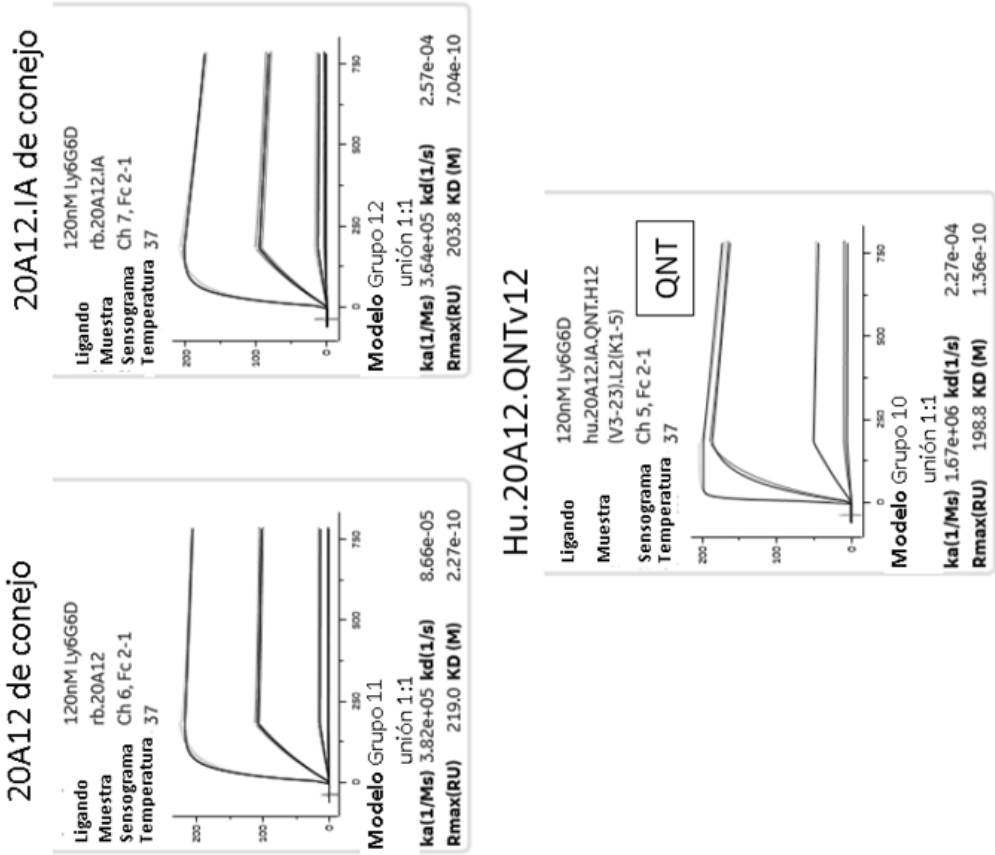


Figura 34D

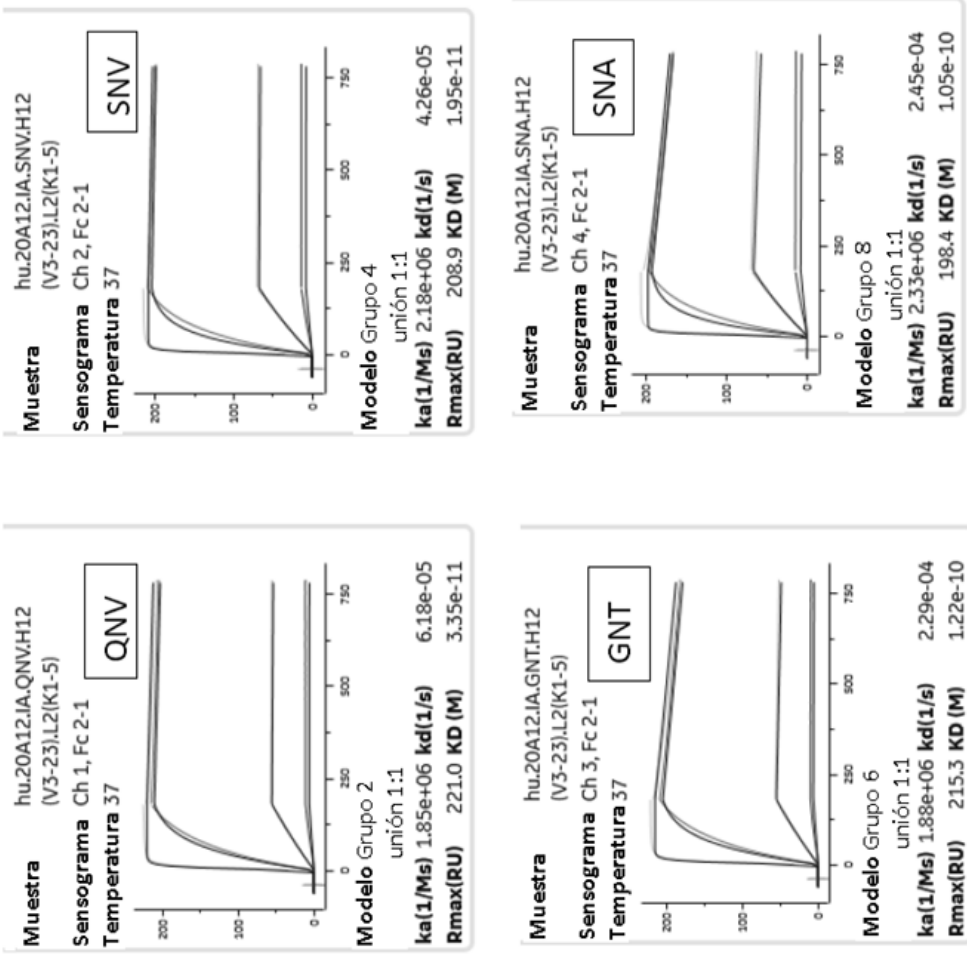


Figura 35A

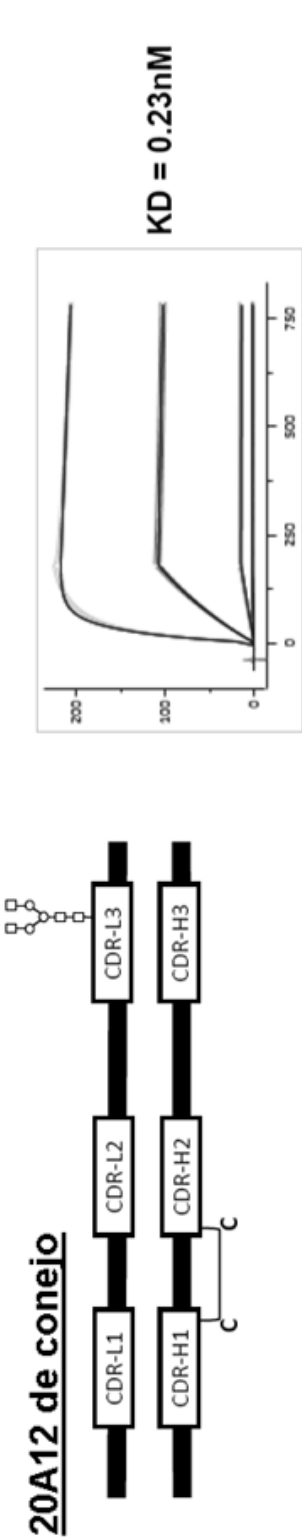


Figura 35B

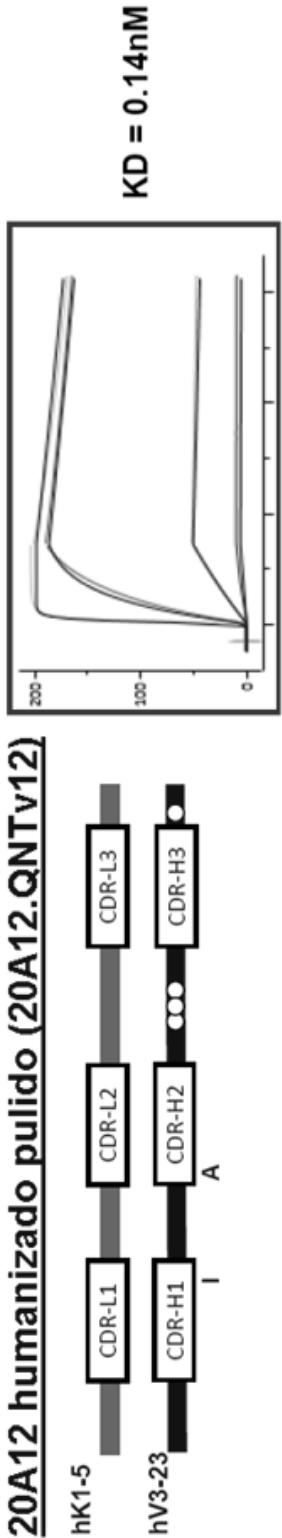
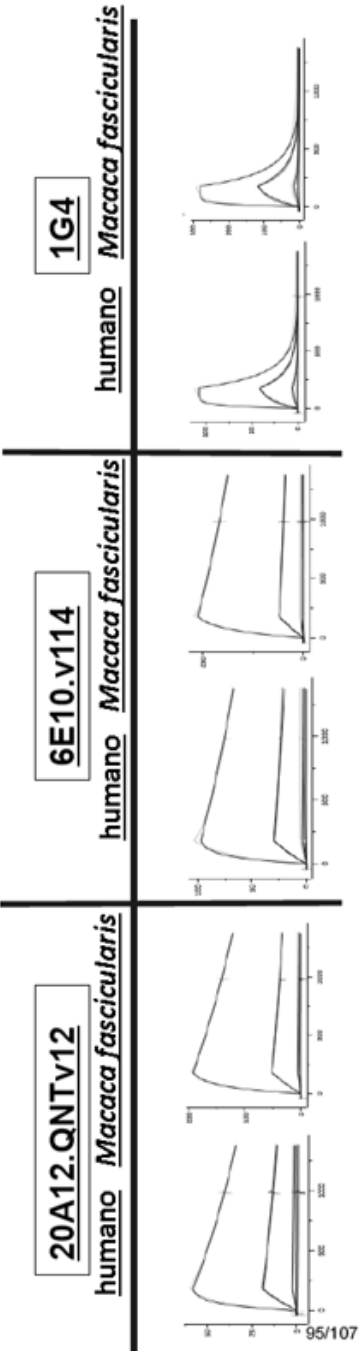


Figura 36



TDB anti-Ly6G6D/CD3	Ly6G6D humano	
	Ly6G6D de <i>Macaca fascicularis</i>	
	KD (nM)	KD (nM)
20A12.QNTv12/38E4v1	2.02	2.29
6E10.H11L4/38E4v1	1.58	1.87
1G4/38E4v1	16.30	13.12

Figura 37

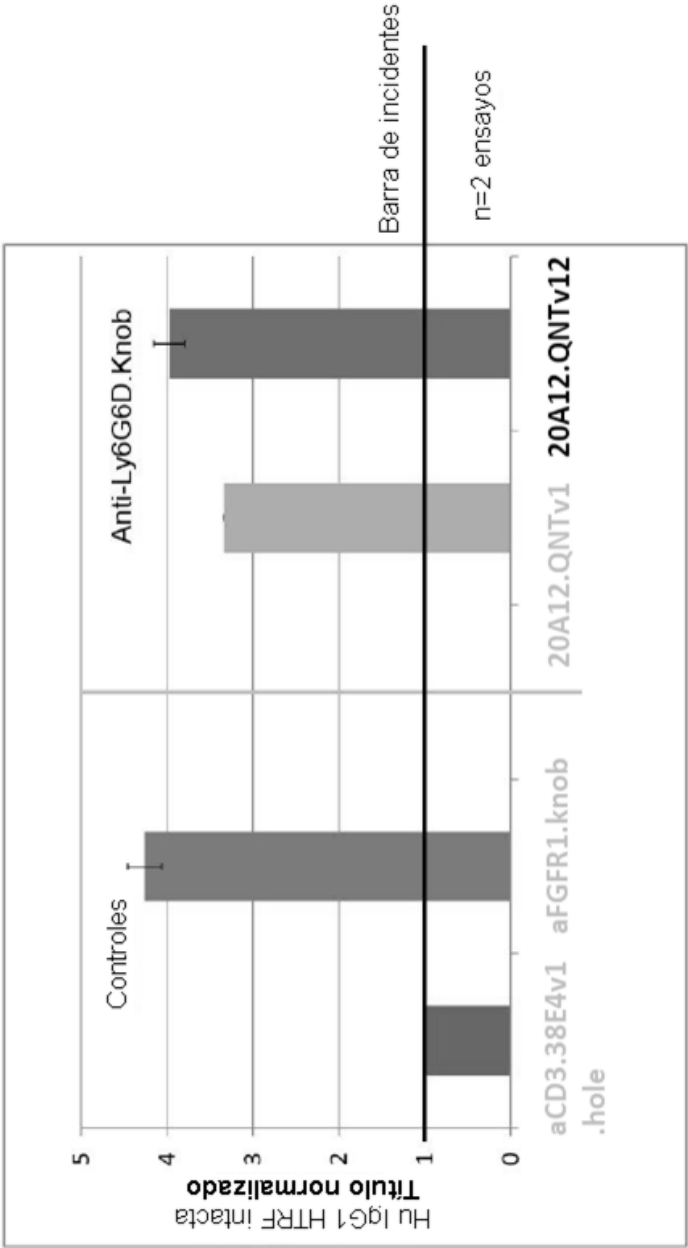


Figura 38

Síntesis, normalizado a anti-Lye6E a 100 nM				
PLACA1	ID	Valores normalizados		
		RESULTADO	CTRL ALTO	CTRL BAJO
	En blanco	0.05	3.70	0.08
	20A12.ver1/38E4.v1	0.09		
	20A12.ver1/40G5c	0.06		
	20A12.ver1.polished/38E4.v1	0.10		
	20A12.ver1.polished/40G5c	0.07		
	1G4/38E4.v1	0.14		
	1G4/40G5c	0.08		

Corte alto/bajo: 1
Resaltado bajo: 0.8
Resaltado alto: 1.2

Figura 39

	20A12.QNTv12/38E4v1	20A12.QNTv12/40G5c
SEC	Pérdida de monómero (0,3 %) aceptable a t=2 sem	Pérdida de monómero (0,4 %) aceptable a t=2 sem
Variantes de carga	Pérdida de pico principal (7,3 %) aceptable a t=2 sem	Pérdida de pico principal (6,8 %) aceptable a t=2 sem
Masa reducida	Sin cambios tras tensión	Sin cambios tras tensión
Tensión térmica	20A12.QNTv12	20A12.QNTv12
	38E4v1	40G5c
AAPH Tensión por oxidación	- D(50)A - N(96)T - N(32)A - N(31)N - N(55)T - D(28)F	- N(96)T - N(32)A - N(31)N - N(55)T - D(50)A - D(28)F
	- M(34) - W(62) - M(93)	- M(34) - W(62) - M(93)



Sin conflictos aparentes.

Precaución: riesgo de demoras, requisitos de recursos adicionales y/o riesgo en método de administración, semivida, etc.

Alta probabilidad de demoras, requisitos de recursos adicionales y/o riesgo en método de administración, semivida, etc.

Figura 40A

Cadena Iiviana, Kappa: anticuerpo humanizado alineado a hu.20A12.K1-39.V3-23

[illegible]

Cadena pesada: anticuerpo humanizado alineado a hu.20A12.K1-39.V3-23

[illegible]

* Interacciones FW-CDR: Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169; Foote and Winter JMB (1992) 224:487

* Interacciones VH-VL: Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169

100/107

Número de Cabal	ro 20A12	20A12.QNTV1	20A12.QNTV2	20A12.QNTV3	20A12.QNTV4	20A12.QNTV5	20A12.QNTV6	20A12.QNTV7	20A12.QNTV8	20A12.QNTV9	20A12.QNTV10	20A12.QNTV11	20A12.QNTV12	20A12.QNTV13	20A12.QNTV14	20A12.QNTV15	20A12.QNTV16	20A12.QNTV17	20A12.QNTV18	20A12.QNTV19	20A12.QNTV20	20A12.QNTV21	20A12.QNTV22	20A12.QNTV23	20A12.QNTV24	20A12.QNTV25	20A12.QNTV26	20A12.QNTV27	20A12.QNTV28	20A12.QNTV29	20A12.QNTV30	20A12.QNTV31	20A12.QNTV32	20A12.QNTV33	20A12.QNTV34	20A12.QNTV35		
1	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
2	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
3	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
4	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
5	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
6	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
7	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
8	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
9	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
10	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
11	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
12	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
13	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
14	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
15	D	I	M	T	Q	S	P	T	L	S	A	V	G	D	R	V	I	T	C	Q	A	S	E															
16	D	I	M	T	Q	S	P	T																														

[illegible]

72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
T	L	T	S	D	L	E	C	A	D	A	T	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	V	N	T	F	G	G	T	E	V	V	K	5Q ID NO: 130	
T	L	T	S	D	L	E	C	A	D	A	T	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	V	N	T	F	G	G	T	E	V	V	K	5Q ID NO: 122	
T	L	T	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	V	N	T	F	G	G	T	K	V	E	K	5Q ID NO: 23
T	L	T	S	S	L	Q	P	D	D	F	A	T	Y	C	Q	S	T	S	F	R	G	R	S	V	N	T	F	G	G	T	K	V	E	K	5Q ID NO: 23

Desventaja en sec rb

[illegible][illegible]

Número de Kabat		CDR H3										CDR H1										CDR H2																					
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
A	D	A	T	A	T	F	C	M	R															G	D	L	W	G	P	G	T	L	V	S	S	E	Q	I	D	N	O	:	131
E	D	A	T	A	T	F	C	M	R														G	D	L	W	G	P	G	T	L	V	S	S	E	Q	I	D	N	O	:	123	
E	D	A	T	A	T	F	C	M	R														G	D	L	W	G	P	G	T	L	V	S	S	E	Q	I	D	N	O	:	22	

* Interacciones FW-CDR: *P*adlan Mol. Immunol. (1994) 31:169; Foote and Winter JMB (1992) 224:487
Interacciones VH-VL: *P*adlan Mol. Immunol. (1994) 31:169

Figura 40C

Cadena liviana, Kappa: anticuerpo humanizado alineado a líneas germinales humanas

Número de Kabat		CDR L1	
hIGKV1-5*01	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	
20A12.QNTv1	D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S W L A W Y		
20A12.QNTv12	D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C Q A S E S I T R Y L N W Y		
Número de Kabat		CDR L2	
hIGKV1-5*01	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71	
20A12.QNTv1	Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T E F		
20A12.QNTv12	Q Q K P G K A P K L L I Y D A S K L P S G V P S R F S G S G S G T E F		
Número de Kabat		CDR L3	
hIGKV1-5*01	72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a b c d	96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107	
20A12.QNTv1	T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q Q Y N S Y S L T F G G G T K V E I K		hIGKJ4 SEQ ID NO: 124
20A12.QNTv12	T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q Q S T S F R G R S Y Q N T F G G G T K V E I K		SEQ ID NO: 122
			SEQ ID NO: 23

Cadena pesada: anticuerpo humanizado alineado a líneas germinales humanas

Número de Kabat		CDR H1	
hIGHV3-23*01	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 40 41 42 43 44	
20A12.QNTv1	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G		
20A12.QNTv12	E V Q L L E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F D F V N N A M I W V R Q A P G K G		
Número de Kabat		CDR H2	
hIGHV3-23*01	45 46 47 48 49 50 51 52 a	53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a b c 83 84	
20A12.QNTv1	L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A		
20A12.QNTv12	L E W V S A L S F A D N T A Y A T W A S G R F T I S R D S S K N T V Y L Q M N S L R A		
Número de Kabat		CDR H3	
hIGHV3-23*01	85 86 87 88 89 90 91 92 93 94	95 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113	
20A12.QNTv1	E D T A V Y Y C A K F D L W G R G T L V T V S S		hIGHJ2*01 SEQ ID NO: 125
20A12.QNTv12	E D T A V Y F C M R G D L W G P S T L V T V S S		SEQ ID NO: 123
			SEQ ID NO: 22

* Interacciones FW-CDR: Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169; Foote and Winter JMB (1992) 224:487
* Interacciones VH-VL: Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169

Figura 41

SEC	Acetato His baja con., pH 5,5: Pérdida de monómero (-0,1 %) aceptable a t=2-sem
Masa reducida	Masas según lo esperado sin cambio tras tensión
Mapeo de péptidos	Datos de prueba de plataforma de tensión térmica (acetato His baja con., pH 5,5)
	-N(30)N
	-D(95a)A
	-N(32)S
	-D(54)G y D(58)Y en CDR-H2 es poco estable, 30,2 % de aumento en isomerización (17,0 % en t=0 y 47,2 % en t=2-sem) *no se puede determinar el sitio de isomerización
	Datos de prueba de PBS de tensión térmica (PBS, pH 7,4)
	-0,3 % de aumento en desamidación N(30)N (2,9 % en t=0 y 3,2 % en t=2-sem)
	-0,5 % de aumento en isomerización D(95a)A (1,5 % en t=0 y 2,0 % en t=2-sem)
	-0,4 % de disminución en desamidación N(32)S (3,3 % en t=0 y 2,9 % en t=2-sem)
	-18,0 % de aumento en isomerización D(54)G y D(58)Y (16,9 % en t=0 y 34,9 % en t=2-sem)
* no se puede determinar el sitio de isomerización	

Figura 42

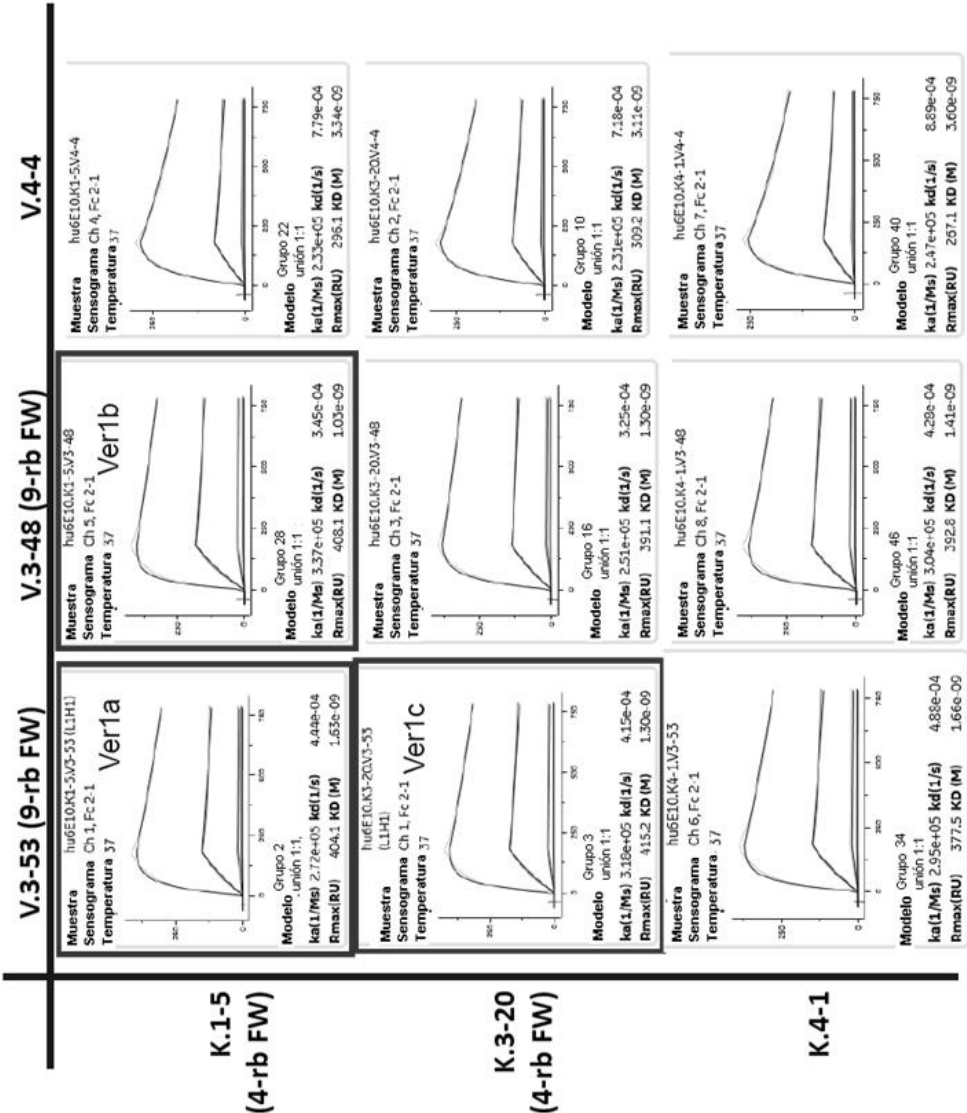


Figura 43A

Cadena liviana, Kappa: anticuerpo humanizado alineado a hu.6E10.K3-20

Número de Kabat			CDRL1																								SEQ.ID NO: 132														
hu.6E10.K3-20	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	a	b	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
hu.6E10.K1-5	E	A	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	Q	S	S	E	S	V	.	.	.	W	H	N	N	W	L	A	W	F
hu.6E10.K4-1	D	A	Q	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	A	T	I	T	C	Q	S	S	E	S	V	.	.	.	W	H	N	N	W	L	A	W	F
	D	A	V	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	A	S	L	I	N	C	Q	S	S	E	S	V	.	.	.	W	H	N	N	W	L	A	W	F	*	
Número de Kabat			CDRL2																								SEQ.ID NO: 133														
hu.6E10.K3-20	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71						
hu.6E10.K1-5	Q	Q	K	P	G	O	R	P	R	L	I	Y	G	A	S	T	L	.	.	.	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F						
hu.6E10.K4-1	Q	Q	K	P	G	K	R	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	L	.	.	.	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	E	F					
	Q	Q	K	P	G	G	R	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	L	.	.	.	A	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	*				
Número de Kabat			CDRL3																								SEQ.ID NO: 134														
hu.6E10.K3-20	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	a	b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107			
hu.6E10.K1-5	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	I	A	G	Y	S	S	S	D	A	.	.	H	V	F	G	G	T	K	V	E	I	K			
hu.6E10.K4-1	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	F	A	T	Y	C	I	A	G	Y	S	S	S	D	A	.	.	H	V	F	G	G	T	K	V	E	I	K				
	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	C	I	A	G	Y	S	S	S	D	A	.	.	H	V	F	G	G	T	K	V	E	I	K	*		

Cadena pesada: anticuerpo humanizado alineado a hu.6E10.V3-53

Número de Kabat			CDR H1																																												
hu.6E10.V3-53	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												
hu.6E10.V4-4	E	Q	L	V	E	S	G	G	L	I	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	L	S	L	S	T	N	S	I	N	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G				
hu.6E10.V3-48	E	Q	L	V	E	S	G	P	G	L	V	K	P	P	G	T	L	S	L	T	C	A	V	S	G	L	S	L	S	T	N	S	I	N	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G		
	*																									*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Número de Kabat			CDR H2																																													
hu.6E10.V3-53	45	46	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84				
hu.6E10.V4-4	L	E	W	I	G	I	Y	I	Y	H	.	G	D	G	I	A	D	Y	A	S	W	A	K	G	R	F	T	I	S	K	D	S	S	K	N	T	V	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A		
hu.6E10.V3-48	L	E	W	I	G	I	Y	I	Y	H	.	G	D	G	I	A	D	Y	A	S	W	A	K	G	R	F	T	I	S	K	D	S	S	K	N	T	V	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A		
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Número de Kabat			CDR H3																																													
hu.6E10.V3-53	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																			
hu.6E10.V4-4	E	D	T	A	V	Y	F	C	I	A	S	G	A	G	Y	S	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	T	L	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 135				
hu.6E10.V3-48	A	D	T	A	V	Y	F	C	I	A	S	G	A	G	Y	S	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	T	L	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO: 136					
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Interacciones FW-CDR: Padian Mol. Immunol. (1994) 31:169; Foote and Winter JMB (1992) 224:487
* Interacciones VH-VL: Padian Mol. Immunol. (1994) 31:169

Cadena pesada: anticuerpo humanizado alineado a rb.6E10

Cadena liviana, Kappa: anticuerpo humanizado alineado a rb.6E10	
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRL1 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 a b A A V L T Q T P S P V S A A V G G T I T I N C I Q S S E S V . . . W H N N W L A W F D A Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C Q S S E S V . . . W H N N W L A W F E A V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C Q S S E S V . . . W H N N W L A W F
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRL2 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 Q K Q P G Q R P R L L I Y G A S T L . . . A S G V P S R F S G T S G S G T Q F Q K Q P G K R P K L L I Y G A S T L . . . A S G V P S R F S G S G S G T E F F Q K Q P G Q A P R L L I Y G A S T L . . . A S G V P D R F S Q S G S G T D F
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRL3 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a b T L T I S D V Q C D D A A T Y Y C A G G Y S S S D A . . . H V F G R G T A V V V K T L T I S S L Q P D D F A A V Y Y C A G G Y S S S D A . . . H V F G G G T K V E I K T L T I S R L E P D E F A V Y Y C A G G Y S S S D A . . . H V F G G G T K V E I K
Cadena pesada: anticuerpo humanizado alineado a rb.6E10	
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRH1 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 Q S L E S G G G L V K P G G T L T C T V S G L S T N S I N . . . W V R Q A P G K G E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G L S T N S I N . . . W V R Q A P G K G E V Q L V E S G G L T Q P G G S L R L S C A A S G L S T N S I N . . . W V R Q A P G K G
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRH2 45 46 47 48 49 50 51 52 a b L E W I G Y I Y H . . . G G G A D Y A S W A K G R F T I S K T S S . . . T T V L R M T S L T V L E W V S Y I Y H . . . G G G A D Y A S W A K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A L E W V S Y I Y H . . . G G G A D Y A S W A K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A
Número de Kabat rb.6E10 6E10.v23 6E10.v14	CDRH3 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A D T A Y F C I A S G A G Y S L . . . F T L W G P G T L V T V S S S E Q I D N O : 141 E D T A V Y C I A S G A G Y S L . . . F T L W G R G T L V T V S S S E Q I D N O : 142 E D T A V Y C I A S G A G Y S L . . . F T L W G R G T L V T V S S S E Q I D N O : 143

[illegible]

Número de Kabat
HNGK3-20'01
rh6E10
6E10.v114

	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	a	b	
CDR L3																											
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	P	.	.	.	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	P	.	.	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S	D	A	.
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	G	G	S	S	S	S</			

[illegible][illegible]

Número de Kódot	55	56	57	58	59	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	
HIGHV3-53*01	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	.	.	.	.	.	.	.	.	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S
rh.6E10	A	D	T	A	T	Y	C	A	S	G	A	G	Y	S	L	.	.	F	T	L	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S
6E10.v114	E	D	T	A	V	Y	C	A	S	G	A	G	Y	S	L	.	.	F	T	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S

Número de Kabat

	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	a	b											
Número de Kábit																																								
hGKV1-5*01	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	C	R	A	S	Q	.	.	.	S	I	S	S	W	L	A	W	Y		
rb.6E10	A	A	V	L	T	Q	T	P	S	P	V	S	A	A	V	G	G	T	I	T	I	N	C	Q	S	E	S	V	.	.	.	W	H	N	N	W	L	A	W	F
6E10.v23	D	A	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	C	Q	S	E	S	V	.	.	.	W	H	N	N	W	L	A	W	F	

Número de Kíobit	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
hIGKV1-5*01	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	Y	D	A	S	L	.	.	.	E	S	V	P	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	.	
rb5E10	Q	K	P	G	K	R	P	R	L	I	Y	G	A	S	T	L	.	.	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	T	G	S	G	T	F	.
6E10.v23	Q	K	P	G	K	R	P	K	L	I	Y	G	A	S	T	L	.	.	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F

[illegible]

Número de Kabat

[illegible]

		CDR H2																																									
45	48	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	83	84
L	E	W	V	S	Y	I	S	S	S	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A		
L	E	W	I	G	Y	I	Y	H	.	G	D	G	I	A	Y	A	S	W	A	K	G	R	F	T	I	S	K	T	S	.	T	T	V	T	L	R	T	S	L	T	V		
L	E	W	V	S	Y	I	Y	H	.	G	D	G	I	A	Y	A	S	W	A	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A

Número de Kábat	CORR 93	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	HIGHJ2*01	SEQ. ID NO: 146
IGHV3-48*01	E D T A V Y Y C A R	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S		
rb.6E10	A D T A T Y F C A S G A G Y S L	F	T	L	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S		
6E10.v23	E D T A V Y Y C A S G A G Y S L	F	T	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S		