

ANTICUERPOS ANTI-Ly6E, INMUNOCONJUGADOS Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.^{os} 63/337.945, presentada el 3 de mayo de 2022 y 63/492.297, presentada el 27 de marzo de 2023, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad para cualquier fin.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias, que se presentó electrónicamente en formato XML. Dicha copia de XML, creada el 14 de abril de 2023, se denomina "2023-04-14_01146-0114-00PCT_ST26.xml" y tiene un tamaño de 46.932 bytes. La información en formato electrónico del listado de secuencias se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Ly6E e inmunoconjugados y métodos para su uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Complejo de antígeno de linfocitos 6, locus E (Ly6E), también conocido como gen E inducido por el ácido retinoico (RIG-E) y antígeno de células madre 2 (SCA-2). Se trata de una proteína ligada a GPI, de 131 aminoácidos de longitud, de ~8,4 kDa, de función desconocida, sin componentes de unión conocidos. Se identificó inicialmente como un transcrito expresado en timocitos inmaduros, células epiteliales medulares tímicas en ratones. Mao *et al.*, "RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5910-5914 (1996).

[0005] Existe una necesidad en el estado de la técnica de agentes que actúen sobre Ly6E para el diagnóstico y tratamiento de afecciones asociadas a Ly6E, tal como cáncer. La invención cumple esa necesidad y proporciona otros beneficios.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0006] La invención proporciona anticuerpos anti-Ly6E, inmunoconjugados y métodos para su uso.

[0007] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a Ly6E, en donde el anticuerpo comprende (i) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, (ii) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, (iii) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, (iv) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, v) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (vi) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

[0008] En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

[0009] En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) una secuencia de VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:32; (b) una secuencia de VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31; o (c) una secuencia de VH como en (a) y una secuencia de VL como en (b). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO:32 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 31.

[0010] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia de VH SEQ ID NO:32 y una secuencia de VL de SEQ ID NO:31.

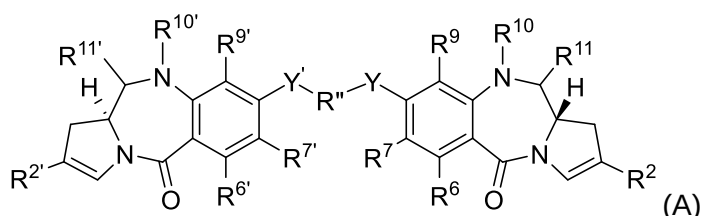
[0011] En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4.

[0012] En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 5 y una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 29. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a Ly6E, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0013] En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico se une a Ly6E y CD3.

[0014] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una célula huésped que expresa el anticuerpo. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de modo que se produzca el anticuerpo.

[0015] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico. En algunas formas de realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula $Ab-(L-D)_p$, en donde: (a) Ab es un anticuerpo proporcionado en la presente; (b) L es un ligador; (c) D es una pirrolobenzodiazepina; y (d) p varía de 1-8. En algunas formas de realización, D es una pirrolobenzodiazepina de fórmula A:



en donde:

R^2 es de fórmula II: Q^1-A-Q^2-X (II), en donde A es un grupo aril C_{5-7} , X se selecciona del grupo que consiste en: OH, SH, CO_2H , COH, $N=C=O$, NHR^N y $(OC_2H_4)_mOCH_3$, en donde R^N se selecciona del grupo que consiste en H y alquil C_{1-4} , y en donde m es un número entero de 1 a 3, y:

(i) Q^1 es un enlace único, y Q^2 se selecciona de un enlace único y $-Z-(CH_2)_n-$, en donde Z es un enlace único, O, S o NH y n es un número entero de 1 a 3; o

(ii) Q^1 es $-CH=CH-$, y Q^2 es un enlace único;

$R^{2'}$ es un grupo aril C_{5-10} , opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano, éter, alquil C_{1-7} , heterociclil C_{3-7} y bis-oxi-alquilen C_{1-3} ;

R^6 y R^9 se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , nitro,

Me_3Sn y halo;

R^7 se selecciona del grupo que consiste en H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, $NHRR'$, nitro, Me_3Sn y halo;

donde R y R' se seleccionan independientemente de grupos alquil C_{1-12} , heterociclilo C_{3-20} y aril C_{5-20} opcionalmente sustituidos;

o bien:

(a) R^{10} es H, y R^{11} es OH u OR^A , en donde R^A es alquil C_{1-4} ;

(b) R^{10} y R^{11} forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o

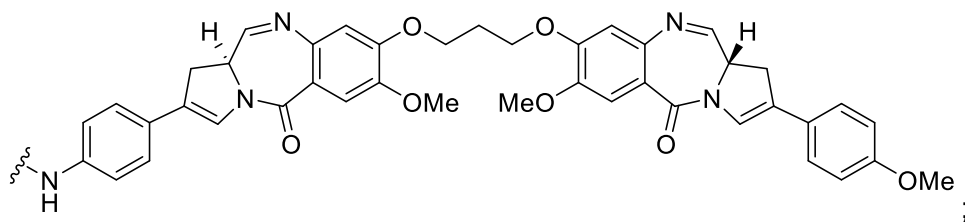
(c) R^{10} es H y R^{11} es SO_zM , en donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

R'' es un grupo alquileo C_{3-12} , cuya cadena se puede interrumpir por uno o más heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en O, S y NH, y/o uno o más anillos aromáticos seleccionados independientemente del grupo que consiste en benceno o piridina;

Y es O, S o NH;

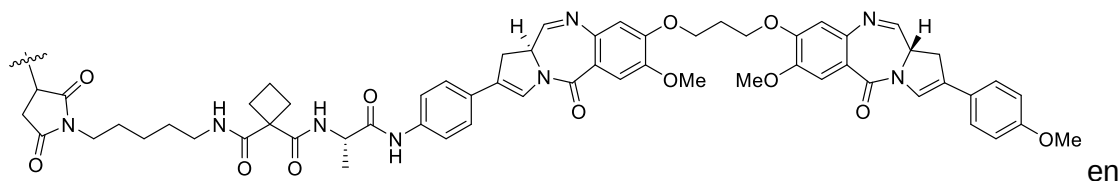
R^6 , R^7 y R^9 se seleccionan de los mismos grupos que R^6 , R^7 y R^9 respectivamente, y $R^{10'}$ y $R^{11'}$ son los mismos que R^{10} y R^{11} respectivamente, en donde si R^{11} y $R^{11'}$ son SO_zM , M puede representar un catión divalente farmacéuticamente aceptable; y el punto de unión al ligador L es a través de R^2 o $R^{2'}$.

[0016] En algunas formas de realización, D tiene la estructura:



en donde la línea ondulada indica el punto de unión al ligador L.

[0017] En algunas formas de realización, (L-D) tiene la estructura:



donde la línea ondulada indica el punto de unión a la proteína.

[0018] En algunas formas de realización, p varía de 1,5-5 o 1,5-6 o 1,5-4 o 2-3.

[0019] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica que comprende el inmunoconjugado y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica comprende un agente terapéutico adicional.

[0020] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo para Ly6E, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del inmunoconjugado o la formulación farmacéutica. En algunas formas de realización, el cáncer positivo para Ly6E se selecciona de un cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico o cáncer gástrico. cáncer de mama

[0021] En algunas formas de realización, el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional al individuo. En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un complejo de platino.

[0022] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para inhibir la proliferación de una célula positiva para Ly6E, en donde el método comprende exponer la célula al inmunoconjugado en condiciones que permiten la unión del inmunoconjugado a Ly6E en la superficie de la célula, y así inhibir la proliferación de la célula. En algunas formas de realización, la célula es una célula de cáncer de mama, pancreático, colon, colorrectal, melanoma, ovario, cáncer de pulmón no microcítico o gástrico.

[0023] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un anticuerpo proporcionado en la presente conjugado con una etiqueta. En algunas formas de realización, la etiqueta es un emisor de positrones. En algunas formas de realización, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

[0024] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para detectar Ly6E humano en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo anti-Ly6E en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-Ly6E a un Ly6E humano natural, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-Ly6E y un Ly6E humano natural en la muestra biológica. En algunas formas de realización, la muestra biológica es una muestra de cáncer de mama, una muestra de cáncer pancreático, una muestra de cáncer de colon, una muestra de cáncer colorrectal, muestra de melanoma, muestra de cáncer de ovario, una muestra de cáncer de pulmón no microcítico o una muestra de cáncer gástrico.

[0025] En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un método para detectar un cáncer positivo para Ly6E que comprende: (i) administrar un anticuerpo anti-Ly6E etiquetado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer positivo para Ly6E, en donde el anticuerpo anti-Ly6E etiquetado comprende un anticuerpo anti-Ly6E proporcionado en la presente; y (ii) detectar el anticuerpo anti-Ly6E etiquetado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti-Ly6E etiquetado indica un cáncer positivo para Ly6E en el sujeto. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-Ly6E etiquetado comprende un anticuerpo anti-Ly6E conjugado con un emisor de positrones. En algunas formas de realización, el emisor de positrones es ⁸⁹Zr.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0026] La figura 1 muestra la estructura del fármaco-ligador (maleimida-sq-ala)-PBD, antes de la conjugación con un anticuerpo anti-Ly6E.

[0027] Las figuras 2A-2C muestran la unión de los anticuerpos anti-Ly6E quiméricos a las células, a través de análisis de citometría de flujo de la unión de anti-Ly6E y 9B12 quiméricos a varias líneas celulares conocidas por expresar Ly6E (figura 2A células Kuramochi, figura 2B NCI-H1781, figura 2C HCC1569x2).

[0028] Las figuras 3A y 3B muestran la unión de los anticuerpos anti-Ly6E quiméricos y humanizados a las células, a través de análisis de citometría de flujo de anti-Ly6E quiméricos y humanizados junto con 9B12 y una unión de control de isotipo a varias líneas celulares conocidas por expresar Ly6E.

[0029] Figuras 4A-4C. La figura 4A muestra un mapa de péptidos de CDR-L3 del anti-Ly6E humanizado (posiciones 61-102 de SEQ ID NO: 17). En las figuras 4B y 4C, el anti-Ly6E humanizado se sometió a cero o dos semanas de estrés térmico y luego se tripsinizó antes del análisis mediante LC-MS/MS. Los picos de los péptidos nativos, isomerizados y que contienen succinimida se integraron en tiempos de retención de 30,6-30,7, 31,1 y 32-32,1 minutos respectivamente.

[0030] La figura 5 muestra unión celular de variantes Fab anti-Ly6E. Se analizaron los Fab anti-Ly6E humanizados y las variantes que pretenden eliminar un sitio de isomerización del ácido aspártico para determinar su unión a las células NCI-H1781 mediante citometría de flujo.

[0031] Las figuras 6A-6B muestran actividad *in vitro* del ADC anti-Ly6E con una carga útil de dímero seco-CBI. Los conjugados anti-Ly6E-SN36325 inducen una muerte celular superior a los ADC no diana o a los conjugados 9B12.

[0032] La figura 7 muestra la actividad *in vitro* del ADC anti-Ly6E con una carga útil de PBD. Los conjugados anti-Ly6E-SGD-1882 inducen una muerte celular superior a los conjugados 9B12.

[0033] Las figuras 8A y 8B muestran la eficacia *in vivo* de los ADC anti-Ly6E en modelo de xenoinjerto tumoral xHCC1569X2. Se evaluó el crecimiento del modelo de mama HCC1569X2 luego de una única administración de vehículo o ADC. Los conjugados se administraron una vez el día 0, y se representan los volúmenes tumorales individuales y los cambios de peso corporal. Los números junto a las trazas indican la dosis de cada conjugado (en mg/kg) que se administró una vez IV el día 0. Los volúmenes tumorales ajustados mediante *spline* cúbico se representan para cada grupo de tratamiento (n=5/grupo). Los ajustes con *spline* cúbico para el grupo de vehículos (línea azul punteada) y el grupo de tratamiento (línea continua) se incluyen como referencia.

[0034] Las figuras 9A-9F muestran la actividad *in vitro* de los anticuerpos biespecíficos anti-Ly6E humanizados. Los acopladores de linfocitos T biespecíficos anti-Ly6E/anti-CD3 inducen la muerte celular en varias líneas celulares. Los anti-Ly6E biespecíficos muestran una actividad mejorada en los 9B12 biespecíficos.

[0035] Las figuras 10A-10B muestran que los Ly6E quiméricos (Ch) 4B10 y 3A3 muestran diferencia de potencia > 400 veces con respecto al control no diana (por ejemplo, los controles de isotipo anti-gD y anti-CD22) en comparación con solo 9 veces con 9B12 en la línea celular NCI-H1781 luego de un ensayo de antiproliferación de 5 días. En la figura 10B, TDC Ab-SN36325 se refiere al conjugado de fármaco ThioMab conjugado con el fármaco Auckland SN36325, y CNJ designa el lote de conjugación.

[0036] Las figuras 11A-B muestran que el Ly6E quimérico (Ch) 3A3 muestra la potencia más alta contra la línea celular HCC1569x2 a pesar de una potencia general más débil con muerte parcial en un ensayo de antiproliferación de 5 días.

[0037] Las figuras 12A-D muestran que los aglutinantes de anticuerpo superiores que usan la generación de imágenes a 1 y 4 horas a 4 °C tienen una clasificación similar que con la unión FACS. La figura 12A muestra que 3A3 tiene la intensidad promedio más alta. La figura 12B-12D muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) más alta por concentración (µg/ml) de 3A3 (3.A3.hlgG1) en las líneas celulares Kuramochi (figura 12B), NCI-H1781 (figura 12C) y HCC-1569x2 (figura 12D).

[0038] La figura 13 muestra que la cantidad de colocación de 3A3 (3.A3.hlgG1) en el lisosoma (por célula) luego de 3 horas es significativamente mayor en comparación con los anticuerpos 1D5.3, 2.5G6, 9B12 y el control negativo. PE – exposición por pulso (anticuerpo lavado), CE – exposición continua.

[0039] La figura 14 muestra que la velocidad de internalización de 9B12 (Ly6E9B12NKD) fue más rápida en comparación con 3A3 (3.A3.hlgG1) pero la unión más alta de 3A3 produce una eficacia duradera como se observa en estudios *in vivo*. PE – exposición por pulso.

[0040] La figura 15 muestra un coeficiente de cambio de Ly6E con respecto a CD22 no diana en la matriz extracelular (ECM) diferente, tales como ECM, GELTREX® (GIBCO™), ligamento periodontal (PDL), fibronectina y solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

[0041] A los fines de la presente, una “estructura aceptora humana” es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable de la cadena liviana (VL) o una estructura de dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humano, como se define a continuación. Una estructura aceptora humana “derivada de” una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de estas o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, la cantidad de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas formas de realización, la estructura aceptora humana de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de estructura de consenso humana.

[0042] “Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su 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 por su componente Y puede representarse en general con la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en el estado de la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente. Los formas de realización ilustrativas y de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión se describen más adelante.

[0043] 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.

[0044] Las expresiones “anticuerpo anti-Ly6E” y “un anticuerpo que se une a Ly6E” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a Ly6E con suficiente afinidad de manera tal que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para actuar sobre Ly6E. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-Ly6E a una proteína no Ly6E no relacionada es menor de alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a Ly6E según se midió, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA) o mediante análisis de scatchard o mediante resonancia de plasmones superficiales, tal como, por ejemplo, BIAcore™. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a Ly6E tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$ 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-Ly6E se une a un epítipo de Ly6E que se conserva entre Ly6E de diferentes especies.

[0045] 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, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

[0046] La expresión “conjugado anticuerpo fármaco” (ADC) como se usa en la presente es equivalente al término “inmunoconjugado”.

[0047] 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, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

[0048] Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o mayor y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia

en un 50 % o mayor. En la presente se proporciona un ejemplo de ensayo de competencia.

[0049] Los términos “cáncer” y “canceroso” describen o se refieren al estado fisiológico en mamíferos caracterizado habitualmente por el crecimiento/la proliferación de células no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales tipos de cáncer incluyen un cáncer que sobreexpresa Ly6E, que puede incluir, por ejemplo, cáncer de mama y/o cáncer de mama metastásico, que incluye cáncer de mama negativo para Her2 y/o cáncer de mama triple negativo, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico (escamoso y/o no escamoso), cáncer gástrico, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0050] El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en donde una porción de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie diferente.

[0051] 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 además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. En algunos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG1. En algunos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG1 con la mutación P329G, L234A y L235A para reducir la función efectora de la región Fc. En otros aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG2. En algunos aspectos, el anticuerpo es del isotipo IgG4 con la mutación S228P en la región bisagra para mejorar la estabilidad del anticuerpo IgG4. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. 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.

[0052] Las expresiones “región constante derivada de origen humano” o “región constante humana” como se usa en la presente solicitud indica una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y/o una región constante de la cadena liviana kappa o lambda. Dichas regiones constantes son conocidas en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (ver además, por ejemplo, Johnson, G., y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788). A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región constante es de acuerdo al sistema de numeración de EU, también denominado índice de EU de Kabat, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH 91-3242.

[0053] La expresión “agente citotóxico”, como se usa en la presente, se refiere 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, clorambucilo, daunorrubicina 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 los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

[0054] “Funciones efectoras” se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

[0055] Una “cantidad eficaz” de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad que es eficaz, en dosis y por períodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[0056] El término “epítipo” se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo.

[0057] La expresión “región Fc” se usa en la presente para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una forma de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado índice de EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

[0058] “Estructura” o “FR” se refieren a residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0059] 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.

[0060] 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 introdujo un ácido nucleico exógeno, que incluye 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 pasajes. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de ácido nucleico con respecto a una célula de origen, pero puede contener mutaciones. En la presente se incluyen progenies mutantes que tienen la misma función o actividad biológica detectada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

[0061] Un “anticuerpo humano” es uno que tiene 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 humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

[0062] Una “estructura 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 VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, 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 una forma de realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, más arriba. En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, más arriba.

[0063] 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 algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los cuales 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. 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.

[0064] La expresión “región hipervariable” o “HVR”, como se usa en la presente, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos (“bucles hipervariables”). Generalmente, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), en donde estas últimas son las de mayor variabilidad de secuencia y/o participan en el reconocimiento del antígeno. Los bucles hipervariables de ejemplo se producen 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)). Las CDR de ejemplo (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos de aminoácidos que forman bucles hipervariables. Las CDR comprenden además “residuos determinantes de la especificidad” o “SDR”, que son residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR se encuentran contenidos dentro de las CDR, denominadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR de ejemplo (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2, y 95-102 de H3. (Ver Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se enumeran en la presente de acuerdo con Kabat *et al.*, más arriba.

[0065] Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluyen, entre otros, un agente citotóxico. Un inmunoconjugado es equivalente a la expresión “conjugado anticuerpo fármaco” (ADC).

[0066] Un “individuo” o “sujeto” 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 algunas formas de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

[0067] Un “anticuerpo aislado” es uno que se separó de un componente de su entorno natural. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica hasta más de 95 % o 99 % de pureza según se determina mediante, por ejemplo, electroforética (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico). Para una reseña sobre métodos de evaluación de la pureza del anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

[0068] 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 localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

[0069] La expresión “ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-Ly6E” se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo (o fragmentos de este), que incluyen moléculas de ácido nucleico en un solo vector o vectores separados, y moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

[0070] El término “Ly6E,” como se usa en la presente, se refiere a cualquier Ly6E nativo, maduro que resulte del procesamiento de una proteína precursora Ly6E en una célula. El término incluye Ly6E de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos y *Macaca fascicularis* o *Macaca mulatta*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término también incluye variantes naturales de Ly6E, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una proteína precursora Ly6E humana de ejemplo, con secuencia de señal (aminoácidos 1-20=secuencia de señal) se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de una Ly6E humana madura de ejemplo se muestra en SEQ ID NO: 24. La secuencia de aminoácidos 1-131 de una Ly6E de *Macaca fascicularis* de ejemplo se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de una Ly6E de *Macaca fascicularis* madura de ejemplo se muestra en SEQ ID NO: 25. La secuencia de aminoácidos de un precursor Ly6E de rata de ejemplo (con secuencia de señal, aminoácidos 1-26) y secuencias maduras se muestran en SEQ ID NO: 23 y 28, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de un precursor Ly6E de ratón de ejemplo (con secuencia de señal, aminoácidos 1-26) y secuencias maduras se muestran en SEQ ID NO: 22 y 27, respectivamente.

[0071] La expresión “cáncer positivo para Ly6E” se refiere a un tipo de cáncer que comprende células que expresan Ly6E en su superficie. A los fines de determinar si una célula expresa Ly6E en la superficie, se cree que la expresión de mRNA de Ly6E se correlaciona con la expresión de Ly6E en la superficie celular. En algunas formas de realización, la expresión de mRNA de Ly6E se determina mediante un método seleccionado de hibridación *in situ* y RT-PCR (que incluye RT-PCR cuantitativo). De manera alternativa, la expresión de Ly6E en la superficie celular puede determinarse, por ejemplo, usando anticuerpos contra Ly6E en un método tal como inmunohistoquímica, FACS, etc. En algunas formas de realización, un cáncer positivo para Ly6E significa un cáncer de mama, cáncer de mama metastásico, que incluye cáncer de mama negativo para Her2 y/o cáncer de mama triple negativo, cáncer

pancreático, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico (escamoso y/o no escamoso), o cáncer gástrico, cada uno de los cuales exhibe un alto nivel de expresión de Ly6E.

[0072] La expresión “célula positiva para Ly6E” se refiere a una célula cancerosa que expresa Ly6E en su superficie.

[0073] 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 comprende 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 una preparación de anticuerpo monoclonal, tales variantes, en general, están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación 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 mediante algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán 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 usan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, tales métodos y otros métodos de ejemplo para elaborar anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

[0074] Un “anticuerpo desnudo” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una porción heteróloga (por ejemplo, una porción citotóxica) o radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

[0075] Los “anticuerpos nativos” se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150,000 dáltones, compuestas por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas mediante un puente de disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, y luego tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, del extremo N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio

liviano variable o dominio variable de la cadena liviana, y luego un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede ser asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

[0076] El término “prospecto” se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, dosis, administración, tratamiento conjunto, contraindicaciones y/o advertencias de uso de tales productos terapéuticos.

[0077] “Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptidos 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 polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación, a fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, se puede lograr de diversas maneras que están dentro del estado de la técnica, por ejemplo, al usar *software* informático disponible al público tal como *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, a los fines de la presente, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando 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 su uso en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde ALIGN-2 se emplea 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:

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

en donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y en donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Cabe destacar que, en donde 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 de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

[0078] 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.

[0079] 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.

[0080] Un "complejo de platino" como se usa en la presente se refiere a fármacos de quimioterapia antineoplásicos tales como, por ejemplo, entre otros, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, iproplatino, satraplatino, CI-973, AZ0473, DWA2114R, nedaplatino, y esprioplatino, que ejercen eficacia contra tumores en función de su capacidad para unirse de manera covalente al ADN.

[0081] 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 por profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la tasa de progresión de

la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorada. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

[0082] La expresión “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo que participa 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 generalmente 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 pueden aislarse 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).

[0083] El término “vector”, como se usa en la presente, 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 donde se introdujo. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente “vectores de expresión”.

[0084] Con respecto a la fórmula A, la expresión “alquil C₁₋₁₂” como se usa en la fórmula A se refiere a una porción monovalente obtenida al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto de hidrocarburo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, que pueden ser alifáticos o alicíclicos, y que pueden ser saturados o insaturados (por ejemplo, parcialmente insaturados, completamente insaturados), pero no aromáticos. En consecuencia, el término “alquilo” incluye las subclases alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc. Los ejemplos de grupos alquilo saturados pueden incluir, entre otros, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y heptilo. Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, entre otros, metilo, etilo, n-propilo (C₃), n-butilo (C₄), n-pentilo (amil) (C₅), n-hexilo (C₆) y n-heptilo. Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C₃), iso-butilo (C₄), sec-butilo (C₄), ter-butilo (C₄), iso-pentilo (C₅), y neo-pentilo (C₅). Un grupo alquenilo como se usa en la presente, con respecto a la fórmula A, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno

o más enlaces dobles carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo pueden incluir, entre otros, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, isopropenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo. En algunas formas de realización, el alquil C_{1-12} de fórmula A es un alquilo acíclico saturado.

[0085] En otros usos en la presente “alquilo” es hidrocarburo C_1-C_{12} que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos son metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), y 3,3-dimetil-2-butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$).

[0086] El término “alquilen C_{3-12} ”, como se usa en la presente y en particular con respecto a la fórmula A, se refiere a una porción bidentada obtenida al eliminar dos átomos de hidrógeno de un compuesto de hidrocarburo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se especifique lo contrario), que pueden ser alifáticos o alicíclicos, y que pueden ser saturados, parcialmente insaturados o completamente insaturados (pero no aromáticos). Los dos átomos de hidrógeno pueden eliminarse del mismo átomo de carbono, o uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes. En consecuencia, el término “alquilen” incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquilen, etc. Los ejemplos de grupos alquilen C_{3-12} lineales saturados pueden incluir, entre otros, $-(CH_2)_n-$ donde n es un entero de 3 a 12, tales como $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ y $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$. Los ejemplos de grupos alquilen C_{3-12} saturados ramificados pueden incluir, entre otros, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$ y $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$. Los ejemplos de grupos alquilen C_{3-12} parcialmente insaturados lineales (alquenilen C_{3-12} , y grupos alquinileno) pueden incluir, entre otros, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-CH=CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-$, -

CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH- y -CH₂-C≡C-CH₂-. Los ejemplos de grupos alquilen C₃₋₁₂ parcialmente insaturados ramificados (alquenilen C₃₋₁₂ y grupos alquinileno) pueden incluir, entre otros, -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- y -C(CH₃)C-CH(CH₃)-. Los ejemplos de grupos alquilen C₃₋₁₂ saturados alicíclicos (cicloalquilen C₃₋₁₂) incluyen, entre otros, ciclopentileno, y ciclohexileno. Los ejemplos de grupos alquilen C₃₋₁₂ parcialmente insaturados alicíclicos pueden incluir, entre otros, ciclopentenileno y ciclohexenileno. En algunas formas de realización de la fórmula A, alquilen C₃₋₁₂ se refiere a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal de la fórmula -(CH₂)₃₋₁₂-, cuyos ejemplos incluyen propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, undecaleno y dodecaleno.

[0087] El término “aril C₅₋₂₀”, como se usa en la presente con respecto a la fórmula A, se refiere a una porción monovalente obtenida al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo aromático de un compuesto aromático, cuya porción tiene de 3 a 20 átomos del anillo. En algunas formas de realización, cada anillo de arilo tiene de 5 a 7 átomos del anillo. Los prefijos, por ejemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, etc., se refieren al número de átomos del anillo, o rango de números de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término “aril C₅₋₆” como se usa en la presente, se refiere a un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos del anillo. En algunas formas de realización todos los átomos del anillo son átomos de carbono, como en un “grupos carboarilo”. Tales grupos carboarilo pueden incluir, entre otros, aquellos derivados de benceno (es decir, fenilo), naftaleno, azuleno, antraceno, fenantreno, naftaceno y pireno. En algunas formas de realización, el arilo comprende anillos fusionados en donde al menos uno de los anillos fusionados es un anillo aromático, tal como por ejemplo, grupos derivados de indano, indeno, isoindeno, tetralina, acenafteno, fluoreno, fenaleno, acefenantreno y aceantreno. En otras formas de realización, los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, tal como en “grupos heteroarilo”. Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos pueden incluir, entre otros, aquellos derivados de pirrolo, piridina, furano. Tiofeno, oxazol, isoxazol, isoxazina, oxadiazol, tiazol, isotiazol y triazol. En algunas formas de realización, el heteroarilo comprende anillos fusionados, en donde al menos uno de los anillos comprende un anillo heteroátomo, tal como grupos derivados de benzofurano, isobenzofurano, isoindol, indolizina, indolina, isoindolina, purina, benzimidazol, indazol y benzoxazol. En algunas formas de realización, con respecto a fórmula A, el aril C₅₋₂₀ es un grupo carboaril C₆-C₂₀.

[0088] “Alquilo sustituido”, “arilo sustituido” y “arilalquilo sustituido” se refieren a alquilo, arilo y arilalquilo, respectivamente, en donde cada uno de uno o más átomos de hidrógeno se reemplaza independientemente por un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, entre otros, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, en donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquil C₂-C₁₈, aril C₆-C₂₀, heterociclil C₃-C₁₄, grupo protector o porción de profármaco. Los grupos alquilenos, alquenileno y alquinileno como se describieron anteriormente también pueden sustituirse de manera similar.

[0089] El término “heterociclil C₃₋₂₀” como se usa en la presente, en particular con respecto a la fórmula A, se refiere a una porción monovalente obtenida al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un compuesto heterocíclico, cuya porción tiene de 3 a 20 átomos del anillo, de los cuales de 1 a 10 son heteroátomos del anillo. En algunas formas de realización, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos del anillo, de los cuales de 1 a 4 son heteroátomos del anillo. En algunas formas de realización, cada heteroátomo se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, N y S. Al referirse a un heterociclilo, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) indican el número de átomos del anillo, o rango de número de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término “heterociclil C₅₋₆”, como se usa en la presente, se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 5 o 6 átomos del anillo, ya sea que dichos átomos del anillo sean de carbono o heteroátomos. Los ejemplos de grupos heterociclilos monocíclicos pueden incluir, entre otros, aquellos derivados de aziridina, azetidina, pirrolidina, pirrolina, piperidina, dihidropiridina, tetrahidropiridina, azepina, oxirano, oxetano, oxolano (tetrahidrofurano), oxol, oxano, dihidropirano, pirano, dioxano, imidazolidina, pirazolidina, imidazolina y pirazolina. En algunas formas de realización, el grupo heterociclilo con respecto a la fórmula A es un anillo mono o bicíclico saturado que comprende de 3 a 10 átomos del anillo, de los cuales de 1 a 3 son heteroátomos del anillo seleccionados independientemente del grupo que consiste en O y N.

[0090] Como se usa en la presente, en particular con respecto a la fórmula A, el término “éter” se refiere al grupo -OR, en donde R es un sustituyente de éter, por ejemplo, un grupo alquil C₁₋₇ (que también puede denominarse grupo alcoxi C₁₋₇), un grupo heterociclil C₃₋₂₀ (que también puede denominarse grupo heterociclioxi C₃₋₂₀), o un grupo

aril C₅₋₂₀ (que también puede denominarse grupo ariloxi C₅₋₂₀). En algunas formas de realización, éter se refiere al grupo -OR, en donde R es un grupo alquil C₁₋₇ saturado.

[0091] “Ligador” se refiere a una porción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une de manera covalente un anticuerpo a una porción de fármaco. En diversas formas de realización, los ligadores incluyen un radical divalente, tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, porciones, tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades de repetición de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida. En diversas formas de realización, los ligadores pueden comprender uno o más residuos de aminoácidos, tales como valina, fenilalanina, lisina y homolisina.

[0092] El término “quiral” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del componente de imagen especular, mientras que el término “aquiral” se refiere a moléculas que son superponibles en su componente de imagen especular.

[0093] El término “estereoisómeros” se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o los grupos en el espacio.

[0094] “Diastereómero” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

[0095] “Enantiómeros” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto, que son imágenes especulares entre sí que no pueden superponerse.

[0096] Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente descripción siguen, por lo general, S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Varios compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, se usan los prefijos D y L, o R y S, para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de sus centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se usan para indicar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, en donde (-) o 1 significa que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con el prefijo

(+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química determinada, estos estereoisómeros son idénticos, con la excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se denomina a menudo una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede ocurrir en donde no hubo estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. La expresión “mezcla racémica” y el término “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

[0097] “Grupo saliente” se refiere a un grupo funcional que puede sustituirse por otro grupo funcional. Algunos grupos salientes son conocidos en el estado de la técnica, y los ejemplos incluyen, entre otros, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metansulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

[0098] La expresión “grupo protector” se refiere a un sustituyente que habitualmente se usa para bloquear o proteger una funcionalidad en particular mientras se hace reaccionar otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un “grupo protector amino” es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Los grupos protectores amino adecuados incluyen, entre otros, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxycarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxy-carbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, ver T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991, o una edición posterior.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

[0099] En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos que se unen a LY6E e inmunoconjugados que comprenden tales anticuerpos. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de tipos de cáncer positivos para LY6E.

A. Anticuerpos anti-Ly6E de ejemplo

[00100] En algunas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a LY6E. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-LY6E tiene al menos una o más de las siguientes características, en cualquier combinación.

[00101] Un anticuerpo de ejemplo no limitativo de la invención es el Ly6E y variantes humanizadas de este. En algunas formas de realización, Ly6E es Ly6E

humano, por ejemplo, Ly6E humano de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, Ly6E se selecciona de Ly6E humano, de *Macaca fascicularis*, de *Macaca mulatta*, de ratón o de rata.

[00102] En algunas formas de realización de este tipo, el anticuerpo anti-Ly6E se une a Ly6E con una afinidad de ≤ 25 nM, o ≤ 20 nM, o ≤ 15 nM, o ≤ 10 nM, o ≤ 9 nM, o ≤ 8 nM, o ≤ 7 nM, o ≤ 6 nM, o ≤ 5 nM, o ≤ 4 nM, o ≤ 3 nM, o ≤ 2 nM, o ≤ 1 nM y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM, o $\geq 0,001$ nM, o $\geq 0,01$ nM según se midió mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) o análisis de scatchard. En algunas formas de realización de este tipo, el anticuerpo anti-Ly6E se une a Ly6E con una afinidad de 0 a 25 nM, 0 a 20 nM, 0 a 10 nM o 10 a 20 nM. En algunas formas de realización, Ly6E es Ly6E humano. En algunas formas de realización, Ly6E es Ly6E humano, Ly6E de ratón, Ly6E de rata o Ly6E de *Macaca fascicularis*. En algunas formas de realización, la afinidad monovalente por Ly6E humano es 10 a 20 nM. En algunas formas de realización, la afinidad bivalente por Ly6E humano es aproximadamente tres veces más potente que la afinidad monovalente.

[00103] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-Ly6E que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

[00104] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12. En una forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En otra forma

de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

[00105] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En una forma de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

[00106] En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:12; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

[00107] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:9.

[00108] En cualquiera de las formas de realización anteriores, se humaniza un anticuerpo anti-Ly6E. En una forma de realización, un anticuerpo anti-Ly6E comprende HVR como se describió en cualquiera de las formas de realización anteriores y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

[00109] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En algunas formas de realización, una secuencia de VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Ly6E que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Ly6E. En algunas formas de realización, se sustituyó, insertó y/o eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO:32. En algunas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Ly6E comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO:32, que incluye las modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. En una forma de realización particular, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

[00110] En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-Ly6E, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31. En algunas formas de realización, una secuencia de VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Ly6E que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Ly6E. En algunas formas de realización, se sustituyó, insertó y/o eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO:31. En algunas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Ly6E comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO:31, que incluye las modificaciones posteriores a la traducción de esa secuencia. En una forma de realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

[00111] En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-Ly6E, 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 una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:31, respectivamente, que incluye modificaciones posteriores a la traducción de dichas secuencias.

[00112] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-Ly6E 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-Ly6E que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO:32 y una secuencia de VL de SEQ ID NO:31.

[00113] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-Ly6E 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 IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en la presente.

[00114] En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-Ly6E, en donde el anticuerpo comprende una HC como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende la HC en SEQ ID NO:5 y LC de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 29, que incluye cualquier modificación posterior a la traducción de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende la HC en SEQ ID NO:5 y LC de SEQ ID NO:3, que incluye cualquier modificación posterior a la traducción de dichas secuencias.

[00115] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe a continuación.

Ensayos

[00116] Si un anticuerpo anti-Ly6E “se une con una afinidad de ≤ 25 nM, o ≤ 20 nM, o ≤ 15 nM, o ≤ 10 nM, o ≤ 9 nM, o ≤ 8 nM, o ≤ 7 nM, o ≤ 6 nM, o ≤ 5 nM, o ≤ 4 nM, o ≤ 3 nM, o ≤ 2 nM, o ≤ 1 nM,” o “0 a 25 nM, 0 a 20 nM, 0 a 10 nM, o 10 a 20 nM” se determina, en algunas formas de realización, de acuerdo con un análisis de scatchard.

De manera alternativa, una afinidad del anticuerpo anti-Ly6E se puede determinar de acuerdo con, por ejemplo, un ensayo BIAcore™. Específicamente, K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Los chips CM5 de grado de investigación BIAcore™ se activan con reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se acoplan IgG anti-Fc humanas de cabra a los chips para obtener aproximadamente 10,000 unidades de respuesta (RU) en cada celda de flujo. Los grupos de acoplamiento sin reaccionar se bloquean con 1M de etanolamina. Para mediciones cinéticas, los anticuerpos anti-Ly6E se capturan para alcanzar aproximadamente 300 RU. Se inyectan diluciones en serie de dos veces de Ly6E humano en amortiguador HBS-P (0,01M de HEPES pH 7,4, 0,15M de NaCl, 0,005 % de tensioactivo P20) a 25 °C con una velocidad de flujo de 30 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir 1:1 (BIAcore™ Evaluation Software versión 3.2). Se calcula la constante de disociación (K_d) de equilibrio como la relación k_{off}/k_{on} . 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 se puede determinar usando 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 25 °C de 20 nM de un anticuerpo antiantígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento 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.

[00117] En cualquiera de las formas de realización anteriores, se humaniza un anticuerpo anti-Ly6E. En una forma de realización, un anticuerpo anti-Ly6E comprende HVR como en cualquiera de las formas de realización anteriores, y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano. En algunas formas de realización, el marco aceptor humano es el marco de consenso de kappa IV de VL (VL_{KIV}) y/o el marco VH_1 de VH.

[00118] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-Ly6E 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 sustancialmente de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en la presente.

[00119] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe a continuación.

[00120] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo humano. En una forma de realización, un anticuerpo anti-Ly6E 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 sustancialmente de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG2a u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en la presente.

[00121] En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe a continuación.

1. Afinidad de los anticuerpos

[00122] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ y, opcionalmente, es $\geq 10^{-13}\text{ M}$. (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).

[00123] En una forma de realización, Kd se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab para antígeno se mide al equilibrar Fab con una concentración mínima de un antígeno etiquetado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulación de 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 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se 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 N.º 269620) se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [¹²⁵I] 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, se incuba el Fab de interés durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período mayor (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la 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 % en PBS. Cuando las placas se secan, se agregan 150 µl/cavidad de escintilador (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante 10 minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o igual a 20 % de la unión máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva.

[00124] De acuerdo con otra forma de realización, Kd se mide usando análisis de scatchard. De acuerdo con otra forma de realización, Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando un BIAcore™ -2000 o un BIAcore™ -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (kon) y de disociación (koff) se calculan usando 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 de equilibrio (Kd) se calcula como la relación koff/kon. Ver, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación excede 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la constante de asociación se puede determinar mediante el uso de una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones

crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo detenido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-AMINCO TM (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpos

[00125] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente es un fragmento de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para obtener una reseña de algunos fragmentos de anticuerpo, 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.

[00126] 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).

[00127] 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).

[00128] Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

[00129] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente 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, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con “cambio de clase”, en donde la clase o subclase se cambió con respecto a la del anticuerpo de origen. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos.

[00130] En algunas formas de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. En general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, al mismo tiempo que conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano de origen. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de estas) derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de estas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente 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 cual derivan los residuos de las HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de un anticuerpo.

[00131] Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se reseñan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además, 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.ºs 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 SDR (a-CDR)); 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 la “selección guiada” en la transposición de FR).

[00132] Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, entre otras: las regiones estructurales seleccionadas mediante el método de “ajuste óptimo” (ver, por ejemplo, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); las regiones estructurales derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena liviana o la cadena pesada (ver, por ejemplo, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285

(1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); las regiones estructurales humanas maduras (mutadas de manera somática) o las regiones estructurales de la línea germinal humanas (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y las 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

[00133] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en el estado de la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

[00134] Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se modificó para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición a antígenos. Tales animales contienen en general la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de manera extracromosómica o integrados de manera aleatoria en los cromosomas del animal. En general, en tales ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena se inactivaron. 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.ºs 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 de forma adicional, por ejemplo, al combinarse con una región constante humana diferente.

[00135] Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar mediante métodos basados en hibridoma. Se describieron líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 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). Otros métodos 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 Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[00136] También se pueden generar anticuerpos humanos mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable del clon de Fv seleccionadas a partir de colecciones de expresión en fago derivadas de seres humanos. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse luego con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

[00137] Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante el cribado de colecciones de combinaciones en busca de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, en el estado de la técnica se conoce una variedad de métodos para generar colecciones de expresión en fago y para cribar tales colecciones en búsqueda de anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Tales métodos se reseñan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, eds., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y también se describen, por ejemplo en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628, (1991); Marks *et al.* *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, (1992); Marks y 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* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

[00138] En algunos métodos de expresión en fago, 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 pueden luego cribarse en busca del fago de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). En general, los fagos exhiben fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las

colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin que sea necesaria la construcción de 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 el uso de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos 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.

[00139] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados a partir de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humanos en la presente.

6. Anticuerpos multiespecíficos

[00140] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En algunas formas de realización, una de las especificidades de unión es para LY6E y la otra es para cualquier otro antígeno. En algunas formas de realización, una de las especificidades de unión es para LY6E y la otra es para CD3. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.821.337. En algunas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de Ly6E. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos de células que expresan Ly6E. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

[00141] Las técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos incluyen, entre otras, la expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina 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, la patente estadounidense N.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden elaborar al modificar por ingeniería genética 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 "diacuerpo" para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos (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 describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

[00142] También se incluyen en la presente anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más sitios de unión a antígenos funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus" (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

[00143] El anticuerpo o fragmento de la presente también incluye un "FAb de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a Ly6E así como otro antígeno diferente (ver, por ejemplo, US 2008/0069820).

7. Variantes de anticuerpos

[00144] En algunas formas de realización, se contemplan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar al introducir modificaciones adecuadas en 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. Puede realizarse cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para lograr la construcción final, siempre que la construcción final tenga las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígenos.

a) Variantes de sustitución, inserción y eliminación

[00145] En algunas formas de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis por sustitución incluyen HVR y 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 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

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
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
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
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
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

[00146] Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: 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.

[00147] Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[00148] Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo de origen (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, las variantes resultantes seleccionadas para estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en algunas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo de origen y/o conservarán sustancialmente algunas propiedades biológicas del anticuerpo de origen. 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 en fagos, tales como las descritas en la presente. Brevemente, uno o más residuos de HVR 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).

[00149] Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones se pueden realizar en los “puntos calientes” de las HVR, 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 SDR (a-CDR), 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.*, *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. Luego, la colección se criba para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en donde varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos por vez) se aleatorizan. Los residuos de HVR que participan en la unión al antígeno se pueden

identificar específicamente, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis de barrido de alanina. En particular, CDR-H3 y CDR-L3 con frecuencia son diana.

[00150] 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 realizarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Tales alteraciones pueden ser fuera de los “puntos calientes” de las HVR o las SDR. En algunas formas de realización de las secuencias de VH y VL variantes que se proporcionaron anteriormente, cada HVR se encuentra inalterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

[00151] Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puedan dirigirse para la mutagénesis se denomina “mutagénesis por barrido de alanina” como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un 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 otras sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos, que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, una estructura de cristal de un complejo antígeno-anticuerpo se usa para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos contiguos pueden ser diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

[00152] Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo del extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo 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 glicosilación

[00153] En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente se altera para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. La

adición o eliminación de sitios de glicosilación en un anticuerpo se puede lograr de manera conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos a fin de crear o eliminar uno o más sitios de glicosilación.

[00154] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a este. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos generalmente 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 con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

[00155] En una forma de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo 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 un anticuerpo de este tipo 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 al calcular la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras 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 se refiere al residuo de asparagina ubicado alrededor de la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse 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 tener función de ADCC mejorada. 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 celulares 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 celulares 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).

[00156] Además se proporcionan variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que se bisecta con GlcNAc un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo. Tales variantes de anticuerpo 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. Tales variantes de anticuerpos pueden tener función de CDC mejorada. Tales 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

[00157] En algunas formas de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente y, de esta manera, generar una variante de la región Fc. 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.

[00158] En algunas formas de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato conveniente para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante; sin embargo, determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/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 ADCC, las células NK, expresan solamente 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 *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 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 *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 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 depuración/semivida usando métodos conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al., Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

[00159] 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.º 6.737.056). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense N.º 7.332.581).

[00160] 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)).

[00161] 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 de EU de residuos).

[00162] 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).

[00163] 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.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Tales variantes de Fc incluyen aquellas 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 de residuo 434 de la región Fc (patente estadounidense N.º 7.371.826).

[00164] Ver también Duncan y 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.

d) Variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína

[00165] 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 de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc

de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

[00166] En algunas formas de realización, se puede modificar adicionalmente un anticuerpo proporcionado en la presente para contener porciones no proteicas adicionales que se conocen en el estado de la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Las porciones adecuadas para la derivación del anticuerpo incluyen, entre otras, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero 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 polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en cuanto a su elaboración debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener 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. En general, la cantidad y/o el tipo de polímeros usados para la derivación pueden determinarse en función de consideraciones que incluyen, entre otros, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si se usará el derivado del anticuerpo en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

[00167] 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. 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.

B. Composiciones y métodos recombinantes

[00168] Los anticuerpos se pueden producir usando composiciones y métodos 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-LY6E descrito en la presente. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas liviana y/o pesada 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 tal ácido nucleico. En una forma de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una forma de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una forma de realización, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-LY6E, 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).

[00169] Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-LY6E, 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 adicionales en una célula huésped. Tal 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).

[00170] Las células huésped adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de polipéptidos y fragmentos de anticuerpos en bacterias, ver, por ejemplo, las patentes de estadounidenses N.^{os} 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), págs. 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.

[00171] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, que incluyen cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se “humanizaron”, lo que generó la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[00172] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se identificaron numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunto con células de insectos, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00173] También se pueden usar cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.ºs 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).

[00174] También se pueden usar células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, las líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas celulares 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 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células del carcinoma de 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 celulares huésped 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 determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por

ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

[00175] Los anticuerpos anti-LY6E proporcionados en la presente pueden identificarse, cribarse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en el estado de la técnica.

[00176] En un aspecto, se analiza un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, a través de métodos conocidos, tales como ELISA, BIAcore™, FACS o análisis de transferencia Western.

[00177] En otro aspecto, se pueden utilizar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compita con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente por la unión a la LY6E. En algunas formas de realización, tal anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo descrito en la presente. Los métodos de ejemplo detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

[00178] En un ejemplo de ensayo de competencia, se incuba LY6E inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une a la LY6E (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente) y un segundo anticuerpo no etiquetado que se encuentra en evaluación para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por la unión a la LY6E. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como un control, LY6E 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 LY6E, se retira el exceso de anticuerpo sin unir, y se mide la cantidad de etiqueta asociada a LY6E inmovilizado. Si la cantidad de etiqueta asociada con LY6E inmovilizada 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 LY6E. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

D. Inmunoconjugados

[00179] La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-LY6E conjugado en la presente con uno o más agentes citotóxicos,

tales como fármacos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o isótopos radiactivos (es decir, un radioconjugado).

[00180] Los inmunoconjugados permiten la administración dirigida de una porción de fármaco a un tumor y, en algunas formas de realización, su acumulación intracelular en este, cuando la administración sistémica de fármacos no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales (Polakis P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387).

[00181] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son moléculas quimioterapéuticas diana que combinan propiedades de los anticuerpos y fármacos citotóxicos al dirigir potentes fármacos citotóxicos a células cancerosas que expresan el antígeno (Teicher, B.A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004), para mejorar de este modo el índice terapéutico al maximizar la eficacia y minimizar la toxicidad fuera de la diana (Carter, P.J. y Senter P.D. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107).

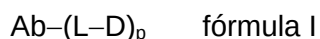
[00182] Los compuestos de ADC de la invención incluyen aquellos con actividad antineoplásica. En algunas formas de realización, los compuestos de ADC incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido de manera covalente, a la porción de fármaco. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une de manera covalente a la porción de fármaco a través de un ligador. Los conjugados del anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención administran selectivamente una dosis eficaz de un fármaco al tejido tumoral con lo que puede lograrse una mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja, aumentando al mismo tiempo el índice terapéutico ("ventana terapéutica").

[00183] La porción de fármaco (D) de los conjugados del anticuerpo-fármaco (ADC) puede incluir cualquier compuesto, porción o grupo que tenga un efecto citotóxico o citostático. Las porciones de fármaco pueden impartir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen, entre otros, unión de tubulina, intercalación o unión de ADN e inhibición de ARN polimerasa, síntesis de proteínas y/o topoisomerasa. Los porciones de fármaco de ejemplo incluyen, entre otros, maitansinoide, dolastatina, auristatina, calicheamicina, pirrolobenzodiazepina (PBD), nemorubicina y sus derivados, PNU-159682, antraciclina, duocarmicina, alcaloide de la vinca, taxano, tricoteceno, CC1065, camptotecina, elinafida y estereoisómeros, isoésteres, análogos y derivados de estos que tengan actividad citotóxica. Los ejemplos no limitativos de tales inmunoconjugados se analizan en detalle a continuación.

1. **Conjugados anticuerpo-fármaco de ejemplo**

[00184] Una forma de realización de ejemplo de un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) que actúa sobre una célula tumoral, una porción de fármaco (D) y una porción ligadora (L) que une Ab a D. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une a la porción ligadora (L) a través de uno o más residuos de aminoácidos, tales como lisina y/o cisteína.

[00185] Un ADC de ejemplo tiene fórmula I:



[00186] en donde p es 1 a alrededor de 20. En algunas formas de realización, la cantidad de porciones de fármaco que se pueden conjugar con un anticuerpo está limitada por la cantidad de residuos de cisteína libre. En algunas formas de realización, los residuos de cisteína libre se introducen en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo mediante los métodos descritos en la presente. El ADC de ejemplo de fórmula I incluye, entre otros, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos cisteína modificados por ingeniería genética (Lyon, R. *et al* (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). En algunas formas de realización, uno o más residuos de cisteína libre ya están presentes en un anticuerpo, sin el uso de modificación por ingeniería genética, en cuyo caso los residuos de cisteína libre existentes pueden usarse para conjugar el anticuerpo con un fármaco. En algunas formas de realización, un anticuerpo se expone a condiciones reductoras antes de la conjugación del anticuerpo a fin de generar uno o más residuos de cisteína libre.

a) Ligadores de ejemplo

[00187] Un “ligador” (L) es una porción bifuncional o multifuncional que puede usarse para ligar una o más porciones de fármaco (D) al anticuerpo (Ab) para formar un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I. En algunas formas de realización, los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar usando un ligador que tiene funcionalidades reactivas para unirse de manera covalente al fármaco y al anticuerpo. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un ligador o un intermediario fármaco-ligador para obtener un ADC.

[00188] En otro aspecto, un ligador tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con una cisteína libre presente en el anticuerpo para formar un enlace covalente. Los ejemplos no limitativos de tales funcionalidades reactivas incluyen maleimida, haloacetamidas, α -haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de

tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Ver, por ejemplo, el método de conjugación de la página 766 de Klussman *et al* (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773, y los Ejemplos en la presente.

[00189] En algunas formas de realización, un ligador tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los ejemplos de tales grupos electrófilos incluyen, entre otros, grupos carbonilos aldehídos y cetonas. En algunas formas de realización, un heteroátomo de la funcionalidad reactiva del ligador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Los ejemplos no limitativos de funcionalidades reactivas incluyen, entre otros, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida.

[00190] Un ligador puede comprender uno o más componentes ligadores. Los ejemplos de componentes ligadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo (un "PAB"), pentanoato de 4-(2-piridiltio) N-Succinimidilo ("SPP") y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("MCC"). En el estado de la técnica se conocen diversos componentes ligadores, algunos de los cuales se describen a continuación.

[00191] Un ligador puede ser un "ligador escindible", lo que facilita la liberación de un fármaco. Los ejemplos no limitativos de ligadores escindibles incluyen ligadores lábiles al ácido (por ejemplo, que comprenden hidrazona), ligadores sensibles a proteasas (por ejemplo, sensibles a peptidasa), ligadores fotolábiles o ligadores que contienen disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); US 5208020).

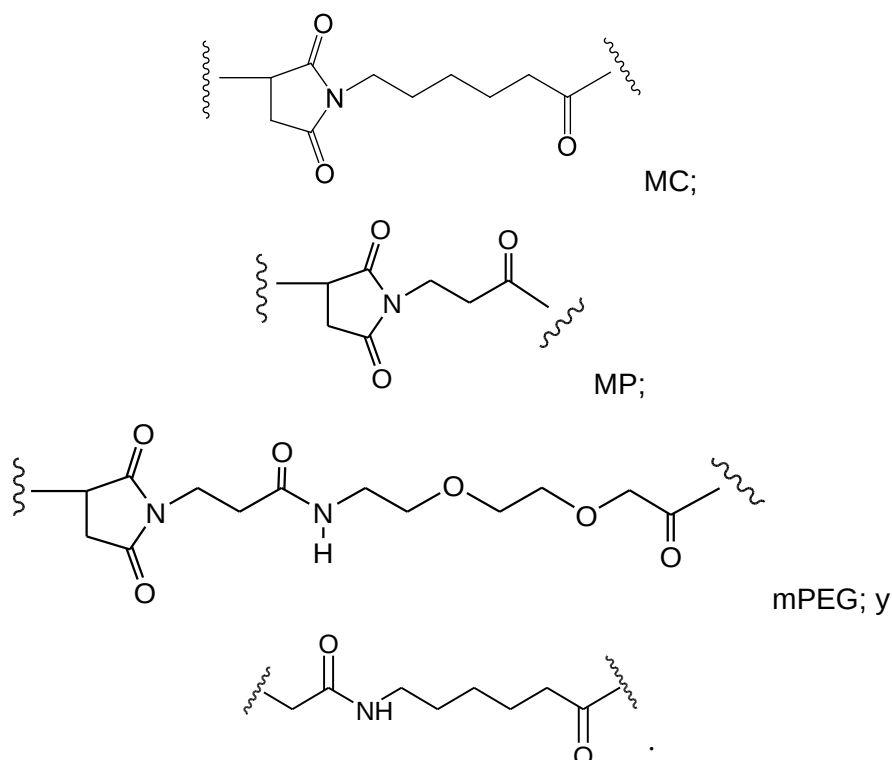
[00192] En algunas formas de realización, un ligador tiene la siguiente fórmula II:



Fórmula II

[00193] en donde A es una "unidad extensora", a es un entero de 0 a 1; W es una "unidad de aminoácido", w es un entero de 0 a 12; Y es una "unidad espaciadora" e y es 0, 1 o 2; y Ab, D y p son como se definió anteriormente para la fórmula I. Las formas de realización de ejemplo de dichos ligadores se describen en la patente estadounidense N.º 7.498.298, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

[00194] En algunas formas de realización, un componente ligador comprende una “unidad extensora” que liga un anticuerpo a otro componente ligador o a una porción de fármaco. Las unidades extensoras de ejemplo no limitativas se muestran a continuación (en donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo, fármaco o componentes ligadores adicionales):

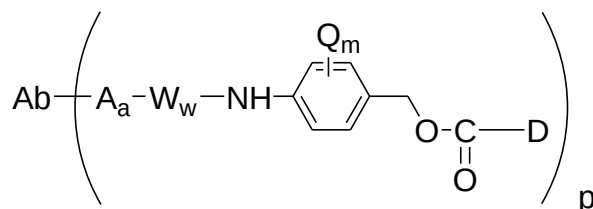


[00195] En algunas formas de realización, un componente ligador comprende una “unidad de aminoácido”. En algunas de las formas de realización de este tipo, la unidad de aminoácido permite la escisión del ligador mediante una proteasa, que facilita de este modo la liberación del fármaco del inmunoconjugado luego de la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas (Doronina *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784). Los ejemplos de unidades de aminoácido incluyen, entre otros, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos de ejemplos incluyen, entre otros, valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); fenilalanina-homolisina (phe-homolys); y N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos de ejemplo incluyen, entre otros, glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácido puede comprender residuos de aminoácidos naturales y/o aminoácidos menores y/o análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Las unidades de aminoácido pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática por parte de

una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

[00196] En algunas formas de realización, un componente ligador comprende una unidad “espaciadora” que une el anticuerpo a una porción de fármaco, directamente o a través de una unidad extensora y/o una unidad de aminoácido. Una unidad espaciadora puede ser una unidad espaciadora “que se inmola” o una unidad espaciadora “que no se inmola”. Una unidad espaciadora “que no se inmola” es aquella en la que una parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la porción de fármaco luego de la escisión del ADC. Los ejemplos de unidades espaciadoras que no se inmolan incluyen, entre otros, una unidad espaciadora glicina y una unidad espaciadora glicina-glicina. En algunas formas de realización, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina mediante una proteasa asociada a célula tumoral produce la liberación de una porción de fármaco glicina-glicina del resto del ADC. En algunas formas de realización de este tipo, la porción de fármaco glicina-glicina se somete a una etapa de hidrólisis en la célula tumoral, para escindir de este modo la unidad espaciadora glicina-glicina de la porción de fármaco.

[00197] Una unidad espaciadora “que se inmola” permite la liberación de la porción de fármaco. En algunas formas de realización, una unidad espaciadora de un ligador comprende una unidad p-aminobencilo. En algunas formas de realización de este tipo, un p-aminobencil alcohol se une a una unidad de aminoácido por medio de un enlace amida, y un carbamato, metilcarbamato o carbonato se elabora entre el alcohol bencilo y el fármaco (Hamann *et al.* (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103). En algunas formas de realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). En algunas formas de realización, un ADC que comprende un ligador que se inmola tiene la estructura:



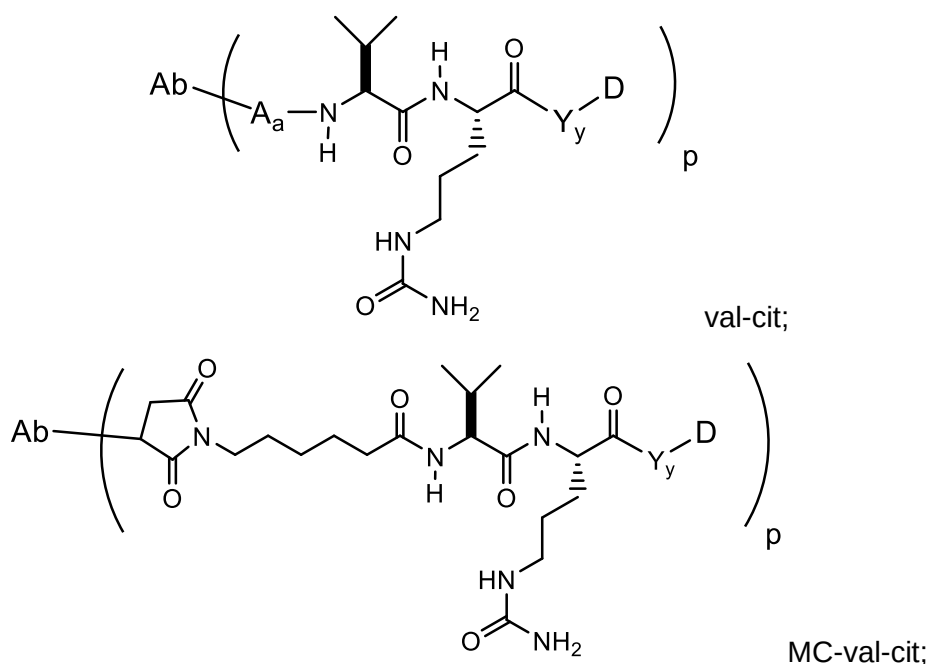
[00198] en donde Q es alquil C₁-C₈, -O-(alquil C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un entero que varía de 0 a 4; y p varía de 1 a alrededor de 20. En algunas formas de realización, p varía de 1 a 10, de 1 a 7, de 1 a 5 o de 1 a 4.

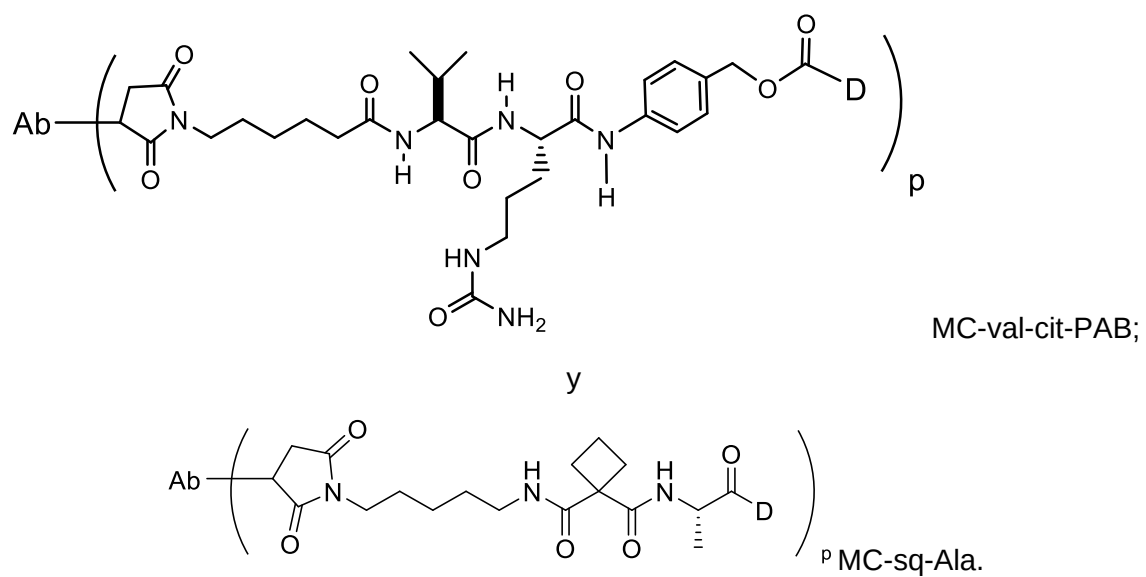
[00199] Otros ejemplos de espaciadores que se inmolan incluyen, entre otros, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (patente estadounidense N.º 7.375.078; Hay

et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. En algunas formas de realización, se pueden usar espaciadores que se sometieron a ciclación luego de hidrólisis de enlaces amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al.* (1995) *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos bicíclicos[2.2.1] y bicíclicos[2.2.2] adecuadamente sustituidos (Storm *et al.*, (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropionico (Amsberry, *et al.* (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). El enlace de un fármaco al α -carbono de un residuo de glicina es otro ejemplo de un espaciador que se inmola que puede ser útil en ADC (Kingsbury *et al.*, (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447).

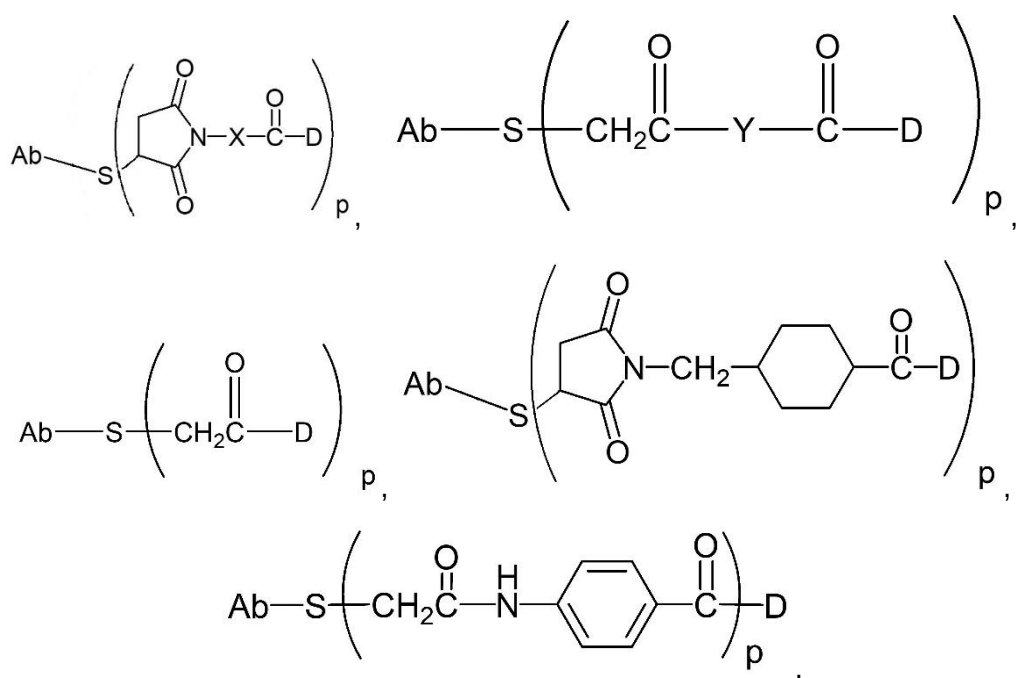
[00200] En algunas formas de realización, el ligador L puede ser un ligador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de una porción de fármaco a un anticuerpo a través de una porción ligadora multifuncional ramificadora (Sun *et al.*, (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun *et al.*, (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Los conectores dendríticos pueden aumentar la proporción molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, si un anticuerpo tiene un solo grupo tiol de cisteína reactivo, una multitud de porciones de fármaco puede unirse a través de un ligador dendrítico.

[00201] Los ligadores de ejemplo no limitativos se muestran a continuación en el contexto de un ADC de fórmula I:

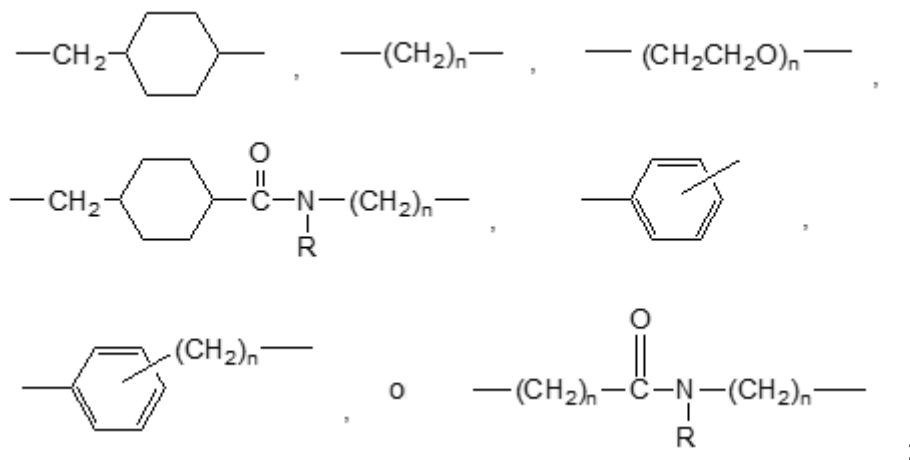




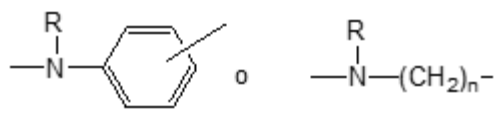
[00202] Los otros ADC de ejemplo no limitativos incluyen las siguientes estructuras en donde -S- es parte del anticuerpo:



en donde X es:



Y es:



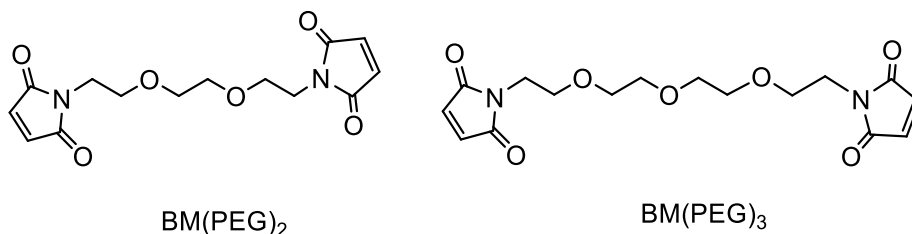
cada R es independientemente H o alquil $\text{C}_1\text{--C}_6$; y n es 1 a 12.

[00203] Por lo general, los ligadores de tipo peptídicos se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con un método de síntesis en fase líquida (por ejemplo, E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, Academic Press).

[00204] En algunas formas de realización, un ligador se sustituye con grupos que modulan la solubilidad y/o reactividad. Como un ejemplo no limitativo, un sustituyente cargado, tal como sulfonato (--SO_3^-) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo conector y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo conector con el anticuerpo y/o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (intermediario anticuerpo-ligador) con D, o D-L (intermediario fármaco-ligador) con Ab, dependiendo de la vía de síntesis empleada para preparar el ADC. En algunas formas de realización, una porción del ligador se acopla con el anticuerpo y una porción del ligador se acopla con el fármaco, y luego el Ab-(porción ligadora)^a se acopla con un fármaco-(porción ligadora)^b para formar el ADC de fórmula I. En algunas formas de realización de este tipo, el anticuerpo comprende más de un sustituyente (porción ligadora)^a, de modo que más de un fármaco se acopla con el anticuerpo en el ADC de fórmula I.

[00205] Los compuestos de la invención expresamente contemplan, entre otros, ADC preparados con los siguientes reactivos ligadores: bis-maleimido-trioxietilenglicol (BMPEO), éster de N-(β -maleimidopropiloxy)-N-hidroxi succinimida (BMPS), éster de N-

(ε-maleimidocaproiloxi) succinimida (EMCS), éster de N-[γ-maleimidobutiriloxi]succinimida (GMBS), 1,6-hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), succinimidil yodoacetato (SIA), succinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), succinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (SMPB), succinimidil 6-[(beta-maleimidopropionamido)hexanoato] (SMPH), iminotiolano (IT), sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y succinimidil-(4-vinilsulfon)benzoato (SVSB), y se incluyen los reactivos de bis-maleimida: ditiobismaleimidoetano (DTME), 1,4-bismaleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bismaleimidohexano (BMH), bismaleimidoetano (BMOE), BM(PEG)₂ (se muestra a continuación) y BM(PEG)₃ (se muestra a continuación); derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), 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 toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). En algunas formas de realización, los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de una cisteína en el anticuerpo con un intermediario ligador-fármaco, ligador o porción de fármaco que contiene tiol. Otros grupos funcionales que son reactivos con grupos tiol incluyen, entre otros, yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.



[00206] En algunas formas de realización, el ligador es un ligador MC-sq-Ala. Los ejemplos de ligadores peptidomiméticos están disponibles, por ejemplo, en WO2015/095227 A2.

[00207] Algunos reactivos ligadores útiles pueden obtenerse de diversas fuentes comerciales, tales como Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en el estado de la técnica; por ejemplo, en Toki *et al.*, (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; Dubowchik *et al.*, (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355; Frisch *et al.*, (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

[00208] El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético etiquetado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Ver, por ejemplo, WO94/11026.

b) Porciones de fármacos de ejemplo

Pirrolobenzodiazepinas

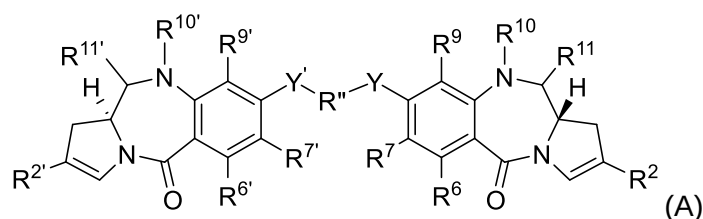
[00209] En algunas formas de realización, un ADC comprende una pirrolobenzodiazepina (PBD). En algunas formas de realización, los dímeros PBD reconocen y se unen a secuencias de ADN específicas. El producto natural antramycin, una PBD, fue descrito por primera vez en 1965 (Leimgruber *et al.*, (1965) *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5793-5795; Leimgruber *et al.*, (1965) *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5791-5793). Desde entonces, se informó una cantidad de PBD, naturales y análogos (Thurston *et al.*, (1994) *Chem. Rev.* 1994, 433-465 que incluyen dímeros del soporte de PBD tricíclico (US 6884799; US 7049311; US 7067511; US 7265105; US 7511032; US 7528126; US 7557099). Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que la estructura dimérica imparte la forma tridimensional adecuada para isohelicidad con la menor muesca de la forma B del ADN, lo que conduce a un ajuste ceñido en el sitio de unión (Kohn, In *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, (1986) *Acc. Chem. Res.*, 19:230-237). Los compuestos diméricos de PBD que portan sustituyentes arilos C2 mostraron ser útiles como agentes citotóxicos (Hartley *et al.*, (2010) *Cancer Res.* 70(17):6849-6858; Antonow (2010) *J. Med. Chem.* 53(7):2927-2941; Howard *et al.*, (2009) *Bioorganic and Med. Chem. Letters* 19(22):6463-6466).

[00210] En algunas formas de realización, los compuestos de PBD se pueden emplear como profármacos al protegerlos en la posición N10 con un grupo protector nitrógeno que es removible *in vivo* (WO 00/12507; WO 2005/023814).

[00211] Los dímeros de PBD se conjugaron con anticuerpos y el ADC resultante mostró tener propiedades antineoplásicas (US 2010/0203007). Los sitios ligadores de

ejemplo no limitativos en el dímero de PBD incluyen el anillo pirrolo de cinco miembros, el enlace entre las unidades de PBD y el grupo imina N10-C11 (WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598).

[00212] En algunas formas de realización de los ADC proporcionados en la presente, la porción de fármaco (por ejemplo, fármaco D) es un compuesto de fórmula A:



en donde:

R^2 es de fórmula II: $\text{Q}^1\text{-A-Q}^2\text{-X}$ (II), en donde A es un grupo aril C_{5-7} , X se selecciona del grupo que consiste en: OH, SH, CO_2H , COH, $\text{N}=\text{C}=\text{O}$, NHR^N y $(\text{OC}_2\text{H}_4)_m\text{OCH}_3$, en donde R^N se selecciona del grupo que consiste en H y alquil C_{1-4} , y en donde m es un número entero de 1 a 3, y:

(i) Q^1 es un enlace único, y Q^2 se selecciona de un enlace único y $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_n-$, en donde Z es un enlace único, O, S o NH y n es un número entero de 1 a 3; o

(ii) Q^1 es $-\text{CH}=\text{CH}-$, y Q^2 es un enlace único;

$R^{2'}$ es un grupo aril C_{5-10} , opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano, éter, alquil C_{1-7} , heterociclil C_{3-7} y bis-oxi-alquilen C_{1-3} ;

R^6 y R^9 se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , nitro,

Me_3Sn y halo;

R^7 se selecciona del grupo que consiste en H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NHRR' , nitro, Me_3Sn y halo;

R y R' se seleccionan independientemente de grupos alquil C_{1-12} , heterociclil C_{3-20} y aril C_{5-20} opcionalmente sustituidos;

o bien:

(a) R^{10} es H, y R^{11} es OH u OR^A , en donde R^A es alquil C_{1-4} ;

(b) R^{10} y R^{11} forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o

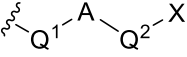
(c) R^{10} es H y R^{11} es SO_2M , en donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

R" es un grupo alquilen C₃₋₁₂, cuya cadena se puede interrumpir por uno o más heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en O, S y NH, y/o uno o más anillos aromáticos seleccionados independientemente del grupo que consiste en benceno o piridina;

Y es O, S o NH;

R^{6'}, R^{7'} y R^{9'} se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹ respectivamente, y R^{10'} y R^{11'} son los mismos que R¹⁰ y R¹¹ respectivamente, en donde si R¹¹ y R^{11'} son SO₂M, M puede representar un catión divalente farmacéuticamente aceptable; y el punto de unión al ligador L es a través de R² o R^{2'}.

[00213] En algunas formas de realización de fórmula (A):

R² es de fórmula II:  (II), en donde A es fenilo, X se selecciona del grupo que consiste en: OH, SH, CO₂H, COH, N=C=O, NHR^N y (OC₂H₄)_mOCH₃, en donde R^N se selecciona del grupo que consiste en H y alquil C₁₋₄, y en donde m es un número entero de 1 a 3, y:

(i) Q¹ es un enlace único, y Q² es un enlace único;

R^{2'} es un grupo fenilo, opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y -OR, en donde R es un grupo alquil C₁₋₇ saturado.;

R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NHRR', nitro, Me₃Sn y halo;

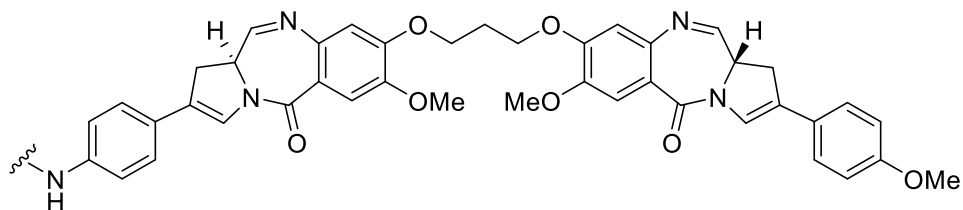
R y R' se seleccionan independientemente de alquil C₁₋₁₂ saturado no sustituido;

R¹⁰ y R¹¹ forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos;

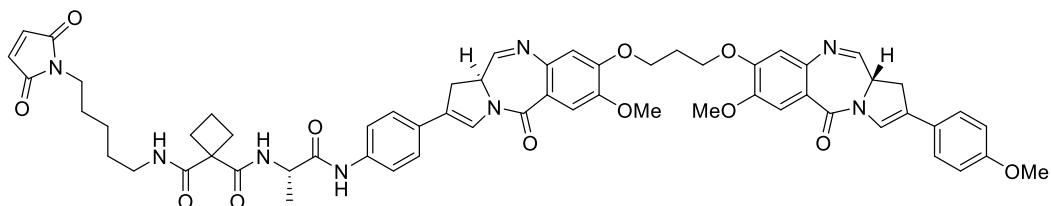
R" es un grupo alquilen C₃₋₁₂ saturado, cuya cadena se puede interrumpir por uno o dos heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en O, S y NH; Y es O, S o NH;

R^{6'}, R^{7'} y R^{9'} se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹ respectivamente, y R^{10'} y R^{11'} son los mismos que R¹⁰ y R¹¹ respectivamente, y el punto de unión al ligador L es a través de R² o R^{2'}.

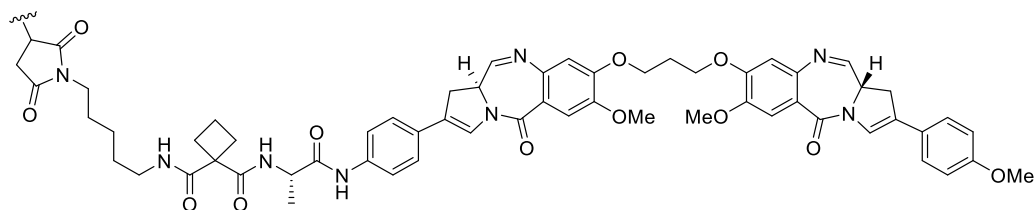
[00214] Las porciones de PDB de ejemplo de ADC incluyen, entre otros, (en donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente al ligador):



[00215] Un ligador-PBD de ejemplo no limitativo tiene la siguiente estructura:



[00216] Una porción de ligador-PBD de ejemplo no limitativo de un ADC incluye, entre otros:



en

donde la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al anticuerpo.

[00217] Los PBD y ADC que comprenden PBD se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598; y WO2010/043880.

c) Carga de fármaco

[00218] La carga de fármaco está representada por p , la cantidad promedio de porciones de fármaco por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 porciones de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un rango de porciones de fármaco, de 1 a 20. La cantidad promedio de porciones de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p . En algunos casos, se pueden lograr la separación, la purificación y la caracterización de ADC homogéneo donde p es un determinado valor de ADC con otras cargas de fármaco mediante medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

[00219] En el caso de algunos conjugados anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por la cantidad de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en determinadas formas de realización de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener solo un grupo tiol de cisteína o varios de estos, o puede tener solo un grupo tiol suficientemente reactivo o varios de estos a través de los cuales puede unirse un ligador. En ciertas formas de realización, una carga de fármaco mayor, por ejemplo, $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En algunas formas de realización, la carga promedio de fármaco para un ADC varía de 1 a alrededor de 8; de alrededor de 2 a alrededor de 6 o de alrededor de 3 a alrededor de 5. En efecto, se ha demostrado que, para ciertos ADC, la relación óptima de porciones de fármaco por anticuerpo puede ser menor de 8, y puede ser de alrededor de 2 a alrededor de 5 (US 7498298).

[00220] En otras formas de realización, menos que el máximo teórico de porciones de fármaco se conjuga con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador, como se analiza a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a una porción de fármaco; en efecto, la mayoría de los residuos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes de disulfuro. En algunas formas de realización, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En algunas formas de realización, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

[00221] La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de diferentes maneras y, por ejemplo, al: (i) limitar el exceso molar del intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador con respecto al anticuerpo, (ii) limitar la temperatura o el tiempo de la reacción de conjugación y (iii) limitar las condiciones reductoras parciales para la modificación de tiol de cisteína.

[00222] Cabe destacar que, cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador, el producto resultante es entonces una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de una o más porciones de fármaco unidas a un anticuerpo. La cantidad promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos ELISA dual, que es

específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Se pueden identificar moléculas de ADC individuales en la mezcla mediante espectroscopía de masas y se las puede separar mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (ver, por ejemplo, McDonagh *et al.*, (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett *et al.*, (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett *et al.* "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", resumen N.º 624, American Association for Cancer Research, reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004; Alley *et al.*, "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", resumen N.º 627, American Association for Cancer Research, reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004). En algunas formas de realización, se puede aislar un ADC homogéneo con un solo valor de carga de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

d) Algunos métodos para preparar inmunoconjugados

[00223] Se puede preparar un ADC de fórmula I mediante varias vías que emplean reactivos, condiciones y reacciones de química orgánica conocidos por las personas del oficio de nivel medio, las cuales incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente para formar Ab-L mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una porción de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de una porción de fármaco con un reactivo ligador bivalente para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen métodos de ejemplo para preparar un ADC de la fórmula I mediante la última vía en US 7498298, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

[00224] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, entre otros: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar en donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en porciones ligadoras y reactivos ligadores, que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; y (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden volverse reactivos para la

conjugación con reactivos ligadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de modo que el anticuerpo se reduzca total o parcialmente. Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la modificación de los residuos de lisina, por ejemplo, al hacer reaccionar los residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que produce la conversión de una amina en un tiol. También se pueden introducir grupos tiol reactivos en un anticuerpo al introducir uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, al preparar variantes de anticuerpos que comprenden uno o más residuos no nativos del aminoácido cisteína).

[00225] Los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse mediante la reacción de un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un fármaco o reactivo ligador. Los grupos nucleófilos útiles en un reactivo ligador incluyen, entre otros, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una forma de realización, se modifica un anticuerpo para introducir porciones electrófilas que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el fármaco o reactivo ligador. En otra forma de realización, los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de porciones de fármaco o reactivos ligadores. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar una conexión estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces estables de amina. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-periodato de sodio puede proporcionar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos adecuados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-periodato de sodio, lo que da como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con una porción de fármaco o un nucleófilo ligador.

[00226] Los grupos nucleófilos de ejemplo en una porción de fármaco incluyen, entre otros: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces

covalentes con grupos electrófilos en porciones ligadoras y reactivos ligadores, que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.

[00227] Los ejemplos no limitativos de reactivos de reticulación que se pueden usar para preparar ADC se describen en la presente en la sección titulada “Ligadores de ejemplo”. Los métodos de uso de tales reactivos de reticulación para ligar dos porciones, que incluyen una porción proteica y una porción química, son conocidos en el estado de la técnica. En algunas formas de realización, una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico puede elaborarse, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican las porciones citotóxicas y de anticuerpo del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[00228] Aún en otra forma de realización, se puede conjugar un anticuerpo con un “receptor” (tal como estreptavidina) para su uso en el pretratamiento dirigido al tumor en donde se administra al paciente el conjugado anticuerpo-receptor, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de depuración y después la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un fármaco o radionucleótido).

E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

[00229] En algunas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-LY6E proporcionados en la presente resulta útil para detectar la presencia de LY6E en una muestra biológica. El término “detectar” como se usa en la presente, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una “muestra biológica” comprende, por ejemplo, una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, que incluye tejidos cancerosos o potencialmente cancerosos de colon, colorrectal, endometrio, páncreas u ovario).

[00230] En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-LY6E para su uso en un método de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de LY6E en una muestra biológica. En algunas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-LY6E descrito en la presente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-LY6E a LY6E, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-LY6E e LY6E en la muestra biológica. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, se usa un anticuerpo anti-LY6E para seleccionar

sujetos idóneos para el tratamiento con un anticuerpo anti-LY6E, por ejemplo, donde LY6E es un biomarcador para la selección de pacientes. En otra forma de realización, la muestra biológica es una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, que incluye tejidos cancerosos o potencialmente cancerosos de colon, colorrectal, endometrio, páncreas u ovario).

[00231] En otra forma de realización, un anticuerpo anti-LY6E se usa *in vivo* para detectar, por ejemplo, al generar imágenes *in vivo*, un cáncer positivo para LY6E en un sujeto, por ejemplo, para los fines de diagnóstico, pronóstico o estadificación del cáncer, lo que determina el curso del tratamiento adecuado o monitorear la respuesta de un cáncer al tratamiento. Un método conocido en el estado de la técnica para detección *in vivo* es tomografía por emisión de inmunopositrones (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen *et al.*, *The Oncologist* 12:1379-1389 (2007) y Verel *et al.*, *J. Nucl. Med.* 44:1271-1281 (2003). En formas de realización de este tipo, se proporciona un método para detectar un cáncer positivo para LY6E en un sujeto, en donde el método comprende administrar un anticuerpo anti-LY6E etiquetado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer positivo para LY6E, y detectar el anticuerpo anti-LY6E etiquetado en un sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti-LY6E etiquetado indica un cáncer positivo para LY6E en el sujeto. En otras formas de realización de este tipo, el anticuerpo anti-LY6E etiquetado comprende un anticuerpo anti-LY6E conjugado con un emisor de positrones, tal como ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr y ^{124}I . En una forma de realización particular, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

[00232] En otras formas de realización, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo anti-LY6E inmovilizado a un sustrato con una muestra biológica a evaluar para determinar la presencia de LY6E, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti-LY6E, y detectar si el segundo anti-LY6E se une a un complejo entre el primer anticuerpo anti-LY6E y LY6E en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio complementario, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, microesferas poliméricas, portaobjetos, chips y otros sustratos. En algunas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, que incluye tejidos cancerosos o potencialmente cancerosos de colorrectal, endometrio, páncreas u ovario). En algunas formas de realización, el primer o segundo anticuerpo anti-LY6E es cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. En formas de realización de este tipo, el segundo anticuerpo anti-LY6E puede ser 6D3 o 7C9; o anticuerpos derivados de 6D3 o 7C9 como se describe en la presente.

[00233] Los trastornos de ejemplo que se pueden diagnosticar o detectar de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores incluyen tipos de cáncer positivos para LY6E, tal como cáncer colorrectal positivo para LY6E (que incluye adenocarcinoma), cáncer de ovario positivo para LY6E (que incluye adenocarcinoma seroso de ovario), cáncer pancreático positivo para LY6E (que incluye adenocarcinoma ductal pancreático) y cáncer de endometrio positivo para LY6E. En algunas formas de realización, un cáncer positivo para LY6E es un cáncer que recibe un puntaje de inmunohistoquímica (IHC) anti-LY6E o hibridación (ISH) *in situ* mayor de "0," que corresponde a muy débil o ninguna tinción en >90 % de las células tumorales. En otra forma de realización, un cáncer positivo para LY6E expresa LY6E a un nivel 1+, 2+ o 3+. En algunas formas de realización, un cáncer positivo para LY6E es un cáncer que expresa LY6E de acuerdo con ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta mRNA de LY6E. En algunas formas de realización, el RT-PCR es RT-PCR cuantitativo.

[00234] En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-LY6E etiquetados. Las etiquetas incluyen, entre otros, etiquetas o porciones que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radioactivos), así como porciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, entre otros, 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, oxidasas sacáridas, por ejemplo, oxidasas de glucosa, oxidasas de galactosa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas con una enzima que usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de rotación, etiquetas bacteriófagas, radicales libres estables y similares. En otra forma de realización, una etiqueta es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, entre otros, ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr y ^{124}I . En una forma de realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr .

F. Formulaciones farmacéuticas

[00235] Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado como se describe en la presente se preparan mezclando dicho anticuerpo o inmunoconjugado con el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En 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 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 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 en la presente incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glicoproteínas hialuronidasas solubles activas neutras (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas 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 las publicaciones de patentes estadounidenses N.^{os} 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

[00236] Los ejemplos de formulaciones liofilizadas de anticuerpos o inmunoconjugados se describen en la patente estadounidense N.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpos o inmunoconjugados 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.

[00237] La formulación en la presente puede contener también más de un ingrediente activo según sea necesario para la afección particular que se trata, preferentemente, aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser conveniente proporcionar adicionalmente un complejo de platino, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer positivo para LY6E tal como, por ejemplo, un cáncer de mama positivo para LY6E, o un cáncer de páncreas positivo para LY6E, o un cáncer de colon positivo para LY6E, o un cáncer colorrectal positivo para LY6E, o un cáncer de melanoma positivo para LY6E, o un cáncer de ovario positivo para LY6E, o un cáncer de pulmón no microcítico positivo para LY6E o un cáncer gástrico positivo para LY6E.

[00238] 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-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Osol, A. Ed., (1980).

[00239] Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

[00240] Por lo general, las formulaciones para su uso en la administración *in vivo* son estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

[00241] Es posible usar cualquiera de los anticuerpos anti-LY6E o inmunoconjugados que se proporcionan en la presente, por ejemplo, en métodos terapéuticos.

[00242] En un aspecto, un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado proporcionado en la presente se usa en un método para inhibir la proliferación de una célula positiva para LY6E, en donde el método comprende exponer la célula al anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado a LY6E en la superficie de la célula, y así

inhibir la proliferación de la célula. En algunas formas de realización, el método es un método *in vitro*. En otras formas de realización, la célula es una célula de cáncer de mama o una célula de cáncer de páncreas o una célula de cáncer de colon, o una célula de cáncer colorrectal, o una célula de cáncer de melanoma, o una célula de cáncer de ovario, o una célula de cáncer de pulmón no microcítico o una célula de cáncer gástrico.

[00243] La inhibición de proliferación celular *in vitro* se puede evaluar usando el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo™, que está disponible en el comercio de Promega (Madison, WI). Ese ensayo determina la cantidad de células viables en cultivo según la cuantificación de ATP presente, que indica células metabólicamente activas. Ver Crouch *et al.*, (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, patente estadounidense N.º 6602677. El ensayo se debe realizar en un formato de 96 o 384 cavidades, lo que la hace apta para el cribado de alto rendimiento (HTS) automatizado. Ver Cree *et al.*, (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. El procedimiento de ensayo consiste en agregar un único reactivo (CellTiter-Glo® Reagent) directamente a las células cultivadas. Esto genera lisis celular y la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos pueden registrarse mediante luminómetro o dispositivo de generación de imágenes con cámara CCD. La producción de luminiscencia se expresa en unidades de luz relativas (RLU).

[00244] En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado para su uso en un método de tratamiento. En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de cáncer positivo para LY6E. En algunas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene cáncer positivo para LY6E, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado. En una forma de realización de este tipo, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

[00245] En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado en la elaboración o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de un cáncer positivo para

LY6E. En otra forma de realización, el medicamento es para su uso en un método para tratar cáncer positivo para LY6E que comprende administrar a un individuo con cáncer positivo para LY6E una cantidad eficaz del medicamento. En una forma de realización de este tipo, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

[00246] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un tipo de cáncer positivo para LY6E. En una forma de realización, el método comprende administrar a un individuo con tal cáncer positivo para LY6E una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-LY6E o inmunoconjugado. En una forma de realización de este tipo, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe más adelante.

[00247] Un cáncer positivo para LY6E de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser, por ejemplo, cáncer de mama positivo para LY6E, o cáncer de páncreas positivo para LY6E, o cáncer de colon positivo para LY6E, o cáncer colorrectal positivo para LY6E, o cáncer de melanoma positivo para LY6E, o cáncer de ovario positivo para LY6E, o cáncer de pulmón no microcítico positivo para LY6E o cáncer gástrico positivo para LY6E. En algunas formas de realización, un cáncer positivo para LY6E es un cáncer que recibe un puntaje de inmunohistoquímica (IHC) anti-LY6E o hibridación (ISH) *in situ* mayor de "0," que corresponde a muy débil o ninguna tinción en >90 % de las células tumorales, en condiciones descritas en la presente. En otra forma de realización, un cáncer positivo para LY6E expresa LY6E a un nivel 1+, 2+ o 3+, como se define en condiciones descritas en la presente. En algunas formas de realización, un cáncer positivo para LY6E es un cáncer que expresa LY6E de acuerdo con ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta mRNA de LY6E. En algunas formas de realización, el RT-PCR es RT-PCR cuantitativo.

[00248] Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede ser un ser humano.

[00249] En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-LY6E o inmunoconjugado proporcionados en la presente, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-LY6E o inmunoconjugados proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los

anticuerpos anti-LY6E o inmunoconjugados que se proporcionan en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

[00250] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En algunas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un complejo de platino, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer positivo para LY6E tal como, por ejemplo, un cáncer de mama positivo para LY6E, o un cáncer de páncreas positivo para LY6E, o un cáncer de colon positivo para LY6E, o un cáncer colorrectal positivo para LY6E, o un cáncer de melanoma positivo para LY6E, o un cáncer de ovario positivo para LY6E, o un cáncer de pulmón no microcítico positivo para LY6E o un cáncer gástrico positivo para LY6E.

[00251] Tales tratamientos conjuntos indicados anteriormente abarcan la administración conjunta (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir antes de, simultáneamente con y/o después de la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse también en combinación con radioterapia.

[00252] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración 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. La administración puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan diversos cronogramas de dosis, que incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples en diversos puntos temporales, la administración por bolo y la infusión de pulso.

[00253] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden formular, dosificar y administrar de manera que respeten las buenas prácticas médicas. Algunos factores que se consideran en este contexto son el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de

la administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario que el anticuerpo o inmuoconjugado se formule con uno o más agentes que se usan en la actualidad 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 o inmuoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores mencionados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosis y mediante las vías de administración descritas en la presente, o alrededor de 1 a 99 % de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía considerada adecuada de manera empírica/clínica.

[00254] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo o inmuoconjugado de la invención (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 o inmuoconjugado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmuoconjugado se administra con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmuoconjugado y el criterio del médico tratante. El anticuerpo o inmuoconjugado se administra adecuadamente al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, se pueden administrar al paciente alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1mg/kg a 10mg/kg) de anticuerpo o inmuoconjugado como dosis inicial candidata, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. En general, en el caso de administraciones repetidas durante el transcurso de varios días o más, según cuál sea la afección, el tratamiento se mantendrá hasta que se logre la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo o inmuoconjugado está en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar 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 pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera tal que el paciente reciba entre alrededor de dos y alrededor de veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se monitorea con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales.

[00255] Cabe destacar que cualquiera de las formulaciones o los métodos terapéuticos anteriores pueden llevarse a cabo usando un inmunocombinado de la invención y un anticuerpo anti-LY6E.

H. Artículos de elaboración

[00256] En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de elaboración comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto 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 el trastorno 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 o inmunocombinado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. Además, el artículo de elaboración puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunocombinado de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de algún otro modo. El artículo de elaboración en esta forma de realización de la invención también puede comprender un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. De manera alternativa o adicional, el artículo de elaboración puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

I. Secuencias

[00257] En otro aspecto, se proporcionan las siguientes secuencias útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos en la presente.

SEQ ID NO:	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
1	<u>MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCF</u> SCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNLVTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E HUMANA con secuencia de señal (aminoácidos 1-20 subrayados)
2	<u>MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCF</u> SCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSTSAGIGNLVTFGHSLSKTCSPACPLPEGINVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASATLLGAGLLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de <i>Macaca fascicularis</i> con secuencia de señal (aminoácidos 1-20 subrayados)
3	<u>DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG</u> <u>SNVDWYQQKP GKAPKLLIYK ASNRYTGVP</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>FSGSGSGTD FTFTIS</u> <u>SLQP EDIATYYCMQ</u> <u>SETKYTFGQG TKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYR REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92E (secuencia de aminoácidos VL 1-106 subrayada, también identificada como SEQ ID NO. 31)
4	DIVMTQSPTS ISISVGERVT MNCKASQNVG SNVDWYQQKT GQSPELLIYK ASNRYTGVP RFTGSGSGTD FTFTISNLQA EDLAVYYCMQ SDTKYTFGAG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYR REAKVQWKVD	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable quimérica

SEQ ID NO:	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
	NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3
5	<u>EVQLVESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFTFS</u> <u>TVAMHWVRQA SGKGLEWVGR IRTKPVNYET</u> <u>YYADSVKGRF TISRDDSKST VYLQMNSLKT</u> <u>EDTAVYYCSA PNYVDGTYSF AYWGQGTLVT</u> <u>VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC</u> LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3 (secuencia de aminoácidos VH 1-123 subrayada, también identificada como SEQ ID NO: 32)
6	AVQLVEFGGG LVQPKESLKI SCAASGFTFS TVAMHWVRQA PGKGLEWIAR IRTKPVNYET YYADSVKGRF TISRDDSKSM VYLQMDNLKT EDAAMYYCSA PNYVDGTYSF AYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK	
7		KASQNVGSNVD	Secuencia de aminoácidos CDR 1 de la cadena liviana variable humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92E
8		KASNRYT	Secuencia de aminoácidos CDR 2 de la cadena liviana variable humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92E
9		MQSETKYT	Secuencia de aminoácidos CDR 3 de la cadena liviana variable humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92E
10		GFTFSTVAMH	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable humanizada CDR 1 de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3

SEQ ID NO:	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
11	RIRTKPVNYETYYADSVKG	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable humanizada CDR 2 de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3
12	SAPNYYDGTYSFAY	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable humanizada CDR 3 de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3
13	<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATT</u> CAGAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGGTTCACCTTCAGTACCGTTG CTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGA AAGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAGAA CCAAACCTGTCAATTACGAGACATACTATGCT GACTCGGTGAAAGGCAGGTTACCATCTCCA GAGATGATTCAAAGTCCACGGTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTTCTGCACCAAATTACTACG ACGGTACTTACTCTTTTGCCTACTGGGGCCA AGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACAC	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3 con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCT CTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG AAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAATGA	
14		<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATT</u> CAGACATC CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CAAGGCGAGTCAGAACGTTGGCTCCAATGTA	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		GATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCCAATCG GTACACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGA AGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACA TATTACTGTATGCAGTCTGAGACTAAGTACAC TTTTGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAA	Ly6E clon 3A3.v2.D92E con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)
15		<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATT</u> CAGACATT GTGATGACTCAGTCTCCACATCCATTTCCAT ATCAGTAGGAGAGAGGGTCACCATGAACTGC AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTTCTAATGTTG ACTGGTATCAACAGAAAACAGGGCAGTCTCC TGAAGTCTTATCTACAAGGCATCCAATCGG TACACTGGCGTCCCTGGTCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTCACTTTACCAT CAGCAACTTGCAGGCTGAAGACCTGGCTGTT TATTACTGTATGCAGTCTGACACCAAGTACAC GTTTGGAGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada quimérica de anticuerpo anti- Ly6E clon 3A3 con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAA	
16		<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATTCA</u> GCGGTA CAACTTGTTGAGTTTGGTGGAGGATTGGTGC AGCCTAAGGAGTCATTGAAAATCTCATGTGC AGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTGTTGCC ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAG GGTCTGGAATGGATTGCTCGCATTAGAACTA AACCTGTTAATTATGAAACATATTATGCTGAT TCAGTGAAAGGCAGATTACCATCTCCCGAG ATGATTCAAAGAGCATGGTCTACCTACAAAT GGATAACTTGAAAAGTGGAGACGCAGCCATG TATTACTGTTGAGCTCCTAATTATTATGATGG TACTTATTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGC ACTCTGGTAACTGTCTCGAGTGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAG CGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada quimérica de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3 con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATGA	
17		DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKASQNVG SNVDWYQQKPK GKSPKLLIYK ASNRYTGVP RFSGSGSGTD FTFTISLQPEDIATYYCMQ SDTKYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3
18		<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATTACAGACATC</u> CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CAAGGCGAGTCAGAACGTTGGCTCCAATGTA GATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCCC CTAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCCAATCG GTACACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGA AGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACA TATTACTGTATGCAGTCTGATACTAAGTACAC TTTTGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTA	humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3 con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)
19		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG SNVDWYQQKP GKSPKLLIYK ASNRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCMQ SDTKYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWCVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.K149C
20		<u>ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT</u> <u>AGCAACTGCAACCGGTGTACATTGACATC</u> CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CAAGGCGAGTCAGAACGTTGGCTCCAATGTA	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		GATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCCC CTAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCCAATCG GTACACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGA AGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACA TATTACTGTATGCAGTCTGATACTAAGTACAC TTTTGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGTG CGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAA	Ly6E clon 3A3.K149C con secuencia de señal (nucleótidos 1-57, subrayados)
21		<u>MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSLNQKSNL</u> YCLKPTICSDQDNYCVTVSTSAGIGNLVTFGHS LSKTCSPACPLPEGINVGVASMGISCCQSFLCN FSAADGGLRASATLLGAGLLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de <i>Macaca</i> <i>mulatta</i> con secuencia de señal (aminoácidos 1-20 subrayados)
22		<u>MSATSNMRVFLPVLLAALLGMEQVHSLMCFSC</u> TDQKNNINCLWPVSCQEKDHYCITLSAAAGFG NVNLGYTLNKGCSPICPSENVNLNLGVASVNS YCCQSSFCNFSAAGLGLRASIPLLGLGLLSLL ALLQLSP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de RATÓN con secuencia de señal (aminoácidos 1-26 subrayados)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
23		<u>MSAASSMRVFLPVLLAALLGVEQVHSL</u> LMCFSC TDQKNNINCLWPVSCSSTDNYCITLSAAAGFG NVNLGYTLNKGCSPTCPRENININLGVASVNSY CCQSSFNCNFSTAGLGLRASIPLLGLGLLLSLLAV LRLSP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de RATA con secuencia de señal (aminoácidos 1-26 subrayados)
24		LMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVS ASAGIGNLVTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGV ASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAG LLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E HUMANA madura (sin secuencia de señal)
25		LMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVS TSAGIGNLVTFGHSLSKTCSPACPLPEGINVG ASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASATLLGAG LLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de <i>Macaca fascicularis</i> madura (sin secuencia de señal)
26		LMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVS TSAGIGNLVTFGHSLSKTCSPACPLPEGINVG ASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASATLLGAG LLLSLLPALLRFGP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de <i>Macaca mulatta</i> madura (sin secuencia de señal)
27		LMCFSCDQKNNINCLWPVSCQEKDHYCITLS AAAGFGNVNLGYTLNKGCSPICPSENVNLNLG VASVNSYCCQSSFNCNFSAAGLGLRASIPLLGLG LLLSLLALLQLSP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de RATÓN madura (sin secuencia de señal)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
28		LMCFSCDQKNNINCLWPVSCSSTDNYCITLSA AAGFGNVNLGYTLNKGCSPTCPRENININLGVA SVNSYCCQSSFCNFSTAGLGLRASIPLLGLGLL LSLLAVLRLSP	Secuencia de aminoácidos de Ly6E de RATA madura (sin secuencia de señal)
29		DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG SNVDWYQQKP GKAPKLLIYK ASNRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCMQ SSTKYTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92S
30		ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGT AGCAACTGCAACCGGTGTACATTCAGACATC CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CAAGGCGAGTCAGAACGTTGGCTCCAATGTA GATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCCAATCG GTACACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGA AGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTACCAT CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACA TATTACTGTATGCAGTCTTCTACTAAGTACAC TTTTGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92S

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAAGAAACAGCTATGACAT GATTACGAATTAA	
31		DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKASQNVG SNVDWYQQKPKAPKLLIYK ASNRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCMQ SETKYTFGQG TKVEIK	Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana variable humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3.v2.D92E
32		EVQLVESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFTFS TVAMHWVRQA SGKGLEWVGR IRTKPVNYET YYADSVKGRF TISRDDSKST VYLQMNSLKT EDTAVYYCSA PNYVDGTYSF AYWGQGTLVT VSS	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3
33		EVQLVESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFTFS TVAMHWVRQA SGKGLEWVGR IRTKPVNYET YYADSVKGRF TISRDDSKST VYLQMNSLKT EDTAVYYCSA PNYVDGTYSF AYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3, sin lisina del extremo C (K)

SEQ NO:	ID	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
		GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
34		AVQLVEFGGG LVQPKESLKI SCAASGFTFS TVAMHWVRQA PGKGLEWIAR IRTKPVNYET YYADSVKGRF TISRDDSKSM VYLQMDNLKT EDAAMYYCSA PNYDGTYSF AYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYPFEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica de anticuerpo anti-Ly6E clon 3A3, sin lisina del extremo C (K)

III. EJEMPLOS

[00258] Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Cabe destacar que pueden ponerse en práctica diversas formas de realización de acuerdo con la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1 - Generación y caracterización de partícula tipo virus (VLP)

[00259] Las células Expi293 se cotransfectaron con un constructo de expresión de mamífero que codifica el Ly6E de longitud completa y un constructo de expresión de mamífero que codifica MLGag. Siete días después de la transfección, las VLP se purificaron del sobrenadante usando ultracentrifugación como se describió anteriormente (ver, por ejemplo, Théry C., *et al.*, "Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids," *Curr Protoc Cell Biology* 2006; 30:3.22.1-3.22.29, y WO2021/247457). Las concentraciones de VLP se midieron usando un ensayo Bradford. La incorporación de Ly6E se confirmó mediante ELISA. Las placas Nunc Maxisorp ELISA (Thermo Scientific) se recubrieron con

diversas concentraciones de VLP diluidas en amortiguador de recubrimiento (50 mM de carbonato, pH 9,6) a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron con amortiguador de lavado (1xPBS con 0,05 % de Tween20) y luego se bloquearon con diluyente de ensayo de ELISA (PBS/0,5 % de BSA/0,05 % de polisorbato 20) a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con anti-Ly6E (9B12; 1 µg/ml diluido en diluyente de ensayo de ELISA). Las placas se lavaron con amortiguador de lavado y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano anti-rata de cabra (Jackson Immunol Lab). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron con amortiguador de lavado y se desarrollaron con solución de TMB (Surmodics, EE.UU.). Las placas se leyeron a 630 nm.

Ejemplo 2 – Inmunización de VLP

[00260] Los animales usados en estos estudios se mantuvieron en una instalación de animales AAALAC acreditada. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de Genentech's Institutional Animal Care and Use Committee y OLAW. La aprobación del diseño del estudio se obtuvo de Genentech Institutional Animal Care and Use Committee antes del inicio de este trabajo.

[00261] Las ratas Sprague Dawley (Charles River, Hollister, CA) se inmunizaron con VLP de Ly6E en PBS junto con adyuvante Ribi (Sigma). Luego, las ratas pueden recibir una dosis de refuerzo tres veces con VLP de Ly6E adicionales, cada 2 semanas. Esto siguió con cuatro inyecciones de un plásmido que codifica cADN de Ly6E mediante Genegun durante 2 semanas. Las balas de ADN/partículas de oro se preparan esencialmente como se describió anteriormente. Ver, por ejemplo, Tang *et al.*, *Nature* 1992; 356:152–4, y Hansen *et al.*, *Sci Rep-uk* 2016; 6:21925.

[00262] Cada bala de ADN se preparó para contener un total de 1 µg de ADN recubiertos en 0,5 mg de partículas de oro (BioRad, Cat. N.º 1652264). Las balas se almacenaron a 4°C en la oscuridad en presencia de pelets desecantes.

[00263] Los pAbs se purificaron mediante proteína A y se sometieron a ensayo mediante FACS para identificar anticuerpos que se unen a superficie celular de Ly6E. Para generar anticuerpos monoclonales, las fusiones de hibridoma se llevaron a cabo como se describió anteriormente excepto con un componente Sp2ab del mieloma que permite expresión superficial de célula IgG. Ver, por ejemplo, Price *et al.*, *J Immunol Methods* 2009; 343:28–41. Vij *et al.*, *Sci Rep-uk* 2018; 8:7136. Los sobrenadantes de hibridoma se recolectaron y la IgG se purificó de sobrenadantes usando MabSelect SuRe (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.). Los hibridomas anti-Ly6E se

identificaron mediante cribado ELISA y FACS. La cadena liviana variable y las secuencias de la cadena pesada del hibridoma anti-Ly6E se determinaron usando 5' RACE seguido por la secuenciación de los productos ampliados PCR. Un clon que muestra unión prometedora se clonó y expresó como un anticuerpo quimérico rata-humano (SEQ ID NO 4 y 6). La proteína purificada se usó para análisis posteriores.

Ejemplo 3 – Caracterización de anti-Ly6E

[00264] El anti-Ly6E quimérico se comparó con un anticuerpo anti-Ly6E previamente descrito (9B12) (Asundi *et al.*, *Clin. Canc. Res.* 2015, 3252-3262) para la unión a células que expresan Ly6E. Las líneas celulares se cultivaron como lo recomendó el ATCC. Antes de la tinción las líneas adherentes se liberaron mediante el tratamiento de acutasa, todas las células se filtraron y equilibraron en amortiguador de tinción de BD (BSA). Las células se tiñeron con anticuerpos primarios en las concentraciones indicadas durante 1 h a 4 °C, se lavaron x 3, se tiñeron con Ab secundario (Jackson ImmunoResearch 109-606-003) (1:100) durante 1 h a 4 °C, se lavaron, se tiñeron con tintura de viabilidad fijable 780 (1:1000) durante 1 h a 4 °C, y se lavaron x 2. Las muestras se fijaron en 1 % de PFA (PBS) antes del análisis. Las muestras se evaluaron en un LSRFortessa BD. Después de la exclusión de células muertas, los singuletes se evaluaron para determinar la unión del anticuerpo usando el *software* FlowJo (figuras 2A-2C). En las tres líneas celulares evaluadas, el anti-Ly6E muestra unión mejorada en comparación con 9B12.

Ejemplo 4 – Humanización y reformato de Ly6E

[00265] El anticuerpo Ly6E se humanizó al injertar CDR HC y LC en estructuras germinales humanas (IGHV3-73*01/IGHJ1*01 y IGKV1-33*01/IGKJ2*01 respectivamente) y al iterar entre residuos humanos y de rata en posiciones de Vernier para maximizar la unión mientras se minimizan los residuos no humanos. La unión del anti-Ly6E humanizado (que comprende SEQ ID NO 3 y 5) se comparó con el anti-Ly6E quimérico (que comprende SEQ ID NO 4 y 6), 9B12 y un control de isotipo (figuras 3A-3B). Contra dos líneas celulares, la versión humanizada mostró unión similar a anti-Ly6E quimérico y unión mejorada frente a 9B12. Los residuos de cisteína se incorporaron en posiciones descritas previamente para permitir la generación en anticuerpos THIOMAB® (Ohri *et al.*, *Bioconj Chem.* 2018, 473-485). Los VH se clonaron en estructuras botón en ojal para generar anticuerpos biespecíficos (Ridgeway *et al.*, *Prot. Eng.* 1996, 617-621).

Ejemplo 5 – Caracterización y optimización de estabilidad de anti-Ly6E

[00266] Para evaluar las posibles responsabilidades de elaboración, anti-Ly6E se incubó en amortiguador de histidina-acetato con fuerza iónica baja pH 5,5 a 40 grados Celsius durante 2 semanas y se analizó mediante mapeo de péptidos esencialmente como se describió anteriormente (Xu *et al. Mol. Pharmaceutics* 2018, 4529-4537). Este estrés térmico dio como resultado 6,2 % de aumento en la cantidad de cadena liviana isomerizada (LC) D92 (figuras 4A-4C). Las mutaciones se incorporaron para eliminar los ácidos aspárticos problemáticos. Las variantes LC D92S (SEQ ID NO.: 29) y LC D92E (SEQ ID NO.: 3) se generaron, proteolizaron a Fabs para generar aglutinantes monovalentes, y se evaluaron para determinar la unión a células NCI-H1781 mediante citometría de flujo como se describió anteriormente (figura 5). Ambas variantes mostraron unión similar a anti-Ly6E humanizado. Cabe destacar que, las cargas Fv de las variantes son 7.5 LC D92S y 6.5 para LC D92E. D92E se seleccionó como el mutante preferido ya que su perfil de carga está mejor alineado con los métodos predictivos para PK normal (Hotzel *et al., mAbs* 2012, 753-760).

Ejemplo 6 – Generación de conjugados anticuerpo-fármaco anti-Ly6E

[00267] Brevemente, un residuo de cisteína se modificó por ingeniería genética en la posición deseada de la cadena pesada y/o la cadena liviana del anticuerpo dirigido al antígeno Her2, Ly6E y CD33 para producir sus variantes TH10MAB. Los anticuerpos TH10MAB se conjugaron en fármacos ligadores como se describió anteriormente. Ver Junutula *et al., Nat Biotechnol* 2008, 26:925-932. Brevemente, el anticuerpo se redujo en presencia de un exceso molar cien veces superior de DTT (Calbiochem) durante la noche. El agente reductor y la cisteína y los bloques de glutatión se purificaron usando columna HiTrap SP-HP (GE Healthcare). El anticuerpo se volvió a oxidar en presencia de un exceso molar quince veces superior de dhAA (MP Biomedical) durante 2,5 horas. La formación de puentes disulfuro intercatenarios se controló mediante LC/MS. Se incubó un exceso molar diez veces superior del fármaco ligador sobre la proteína en presencia de 15 % de DMF con los anticuerpos TH10MAB activados durante 2 o 3 horas. El conjugado anticuerpo fármaco se purificó en columna HiTrap SP-HP (GE Healthcare) para eliminar el exceso de fármaco ligador. Si todavía había agregación de más del 5 % presente por SEC analítica luego se purificó en columna Hi Load Superdex 200 pg 16/600 (GE Healthcare) usando 20mM de acetato de histidina, 150mM de NaCl, pH 5,5 como amortiguador de corrida. La cantidad de moléculas fármaco ligador conjugadas por anticuerpo TH10MAB se cuantificó mediante análisis LC/MS. La pureza se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Análisis de espectrometría de masas

[00268] El análisis LC/MS se llevó a cabo en LC/MS de masas-tiempo de vuelo cuadrupolo preciso 6530 (Q-TOF) (Agilent Technologies). Las muestras se sometieron a cromatografía en una PRLP-S, 1000 Å, 8 µm (50 mm 2,1 mm, Agilent Technologies) calentada hasta 80 °C. Se usó un gradiente lineal de 30–60 % B en 4,3 minutos (solvente A, 0,05 % de TFA en agua; solvente B, 0,04 % de TFA en acetonitrilo) y el eluyente se ionizó directamente usando la fuente de electrospray. Los datos se recolectaron y deconvolucionaron usando el *software* de análisis cualitativo Agilent Mass Hunter. Antes del análisis LC/MS, el conjugado de anticuerpo fármaco se trató con DTT durante 30 minutos a 15mM, pH 8,0, y 37 °C para producir la porción HC y LC para facilitar el análisis. La relación fármaco a anticuerpo (DAR) se calculó usando la abundancia de los iones presente en los resultados deconvulsionados de LC/MS. Los picos se identificaron usando LC/MS.

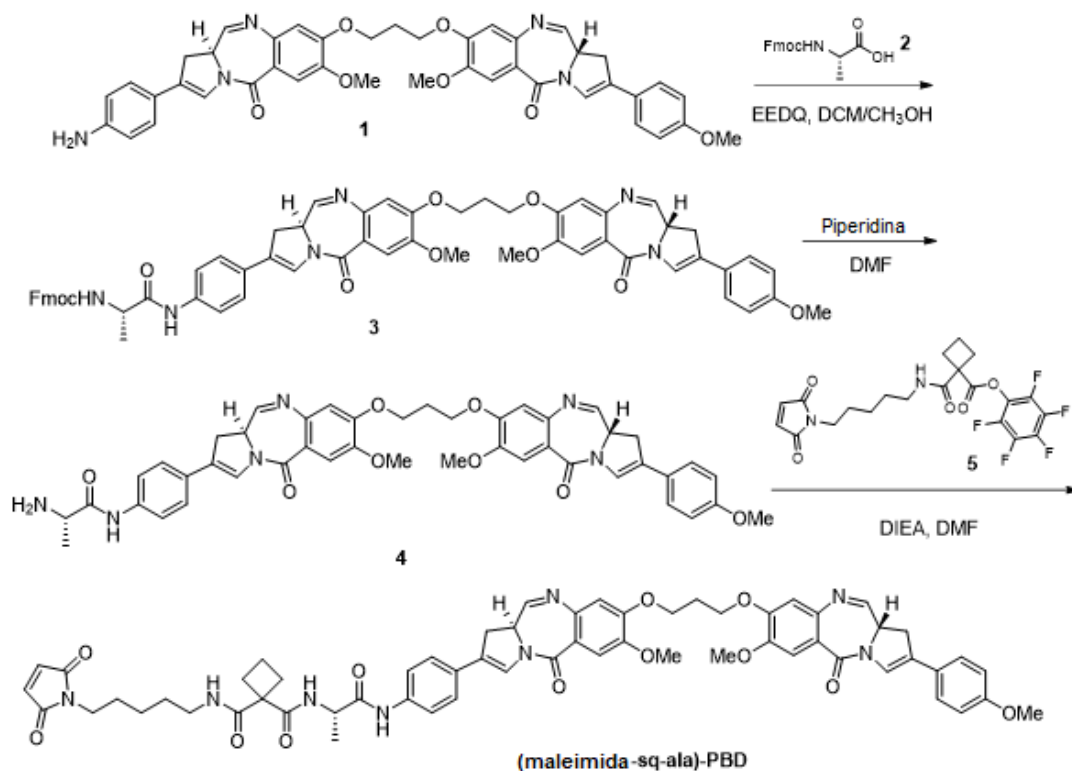
[00269] El análisis de LC/MS de los conjugados reducidos mostró que los conjugados anticuerpo fármaco tuvieron un rango de 1,8-2 fármacos por anticuerpo para todos los conjugados.

Ejemplo 7 – Caracterización de anti-Ly6E como un conjugado anticuerpo-fármaco SN36325

[00270] Las células se sembraron en placas de 384 cavidades, se cultivaron durante 24 h, y se trataron con los ADC indicados, que incluyen los conjugados con controles de isotipo (anti-gD y anti-CD22) y 9B12. Después de 5 días de incubación continua de ADC, la viabilidad celular se determinó usando el reactivo luminiscente Promega CellTiter-Glo®. La intensidad luminiscente se midió usando un lector PerkinElmer EnVision® (figuras 6A-6B). La viabilidad celular relativa se calculó al normalizar con respecto al control sin tratamiento del fármaco. Los conjugados anti-Ly6E mostraron ser más potentes en la inactivación contra las líneas celulares HCC1569x2 y SW900 que el control de isotipo y los conjugados 9B12. Se observaron diferencias mínimas entre las versiones quiméricas y humanizadas de anti-Ly6E.

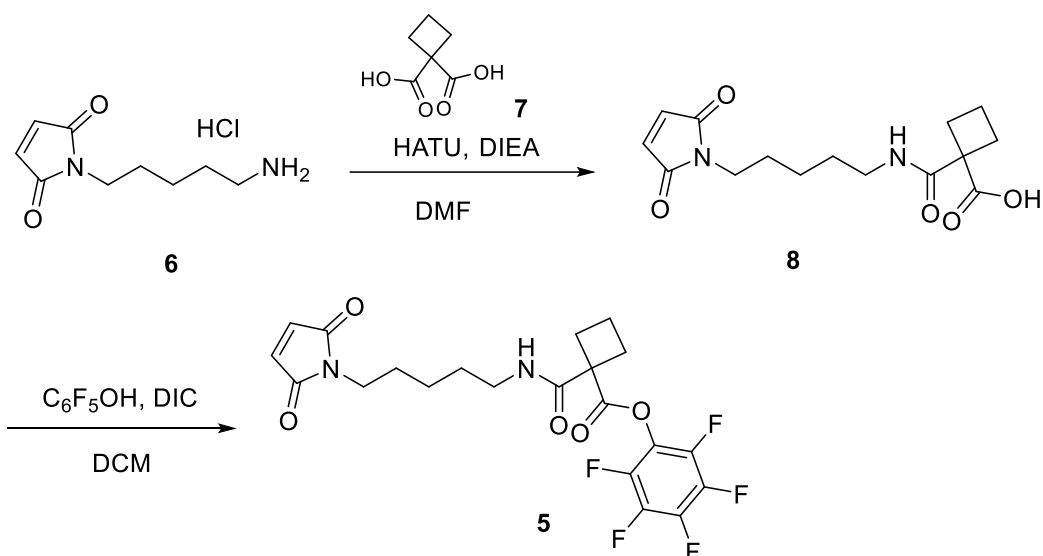
Ejemplo 8 – Síntesis de fármaco-ligador (maleimida-sq-ala)-PBD

[00271] Esquema para síntesis de fármaco-ligador (maleimida-sq-ala)-PBD:

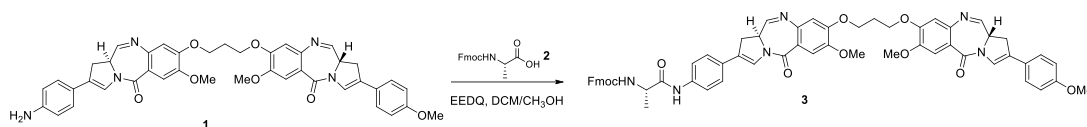


[00272] El ligador maleimida-sq-ala se conjuga con la carga útil de PBD en dos etapas, primero al instalar la alanina y luego al conjugar la maleimida-sq a través de INT5, una maleimida-sq-éster activada. El ligador en este ejemplo tiene un espaciador de 5 carbonos entre la maleimida y la sq.

[00273] Esquema de síntesis del precursor INT5:

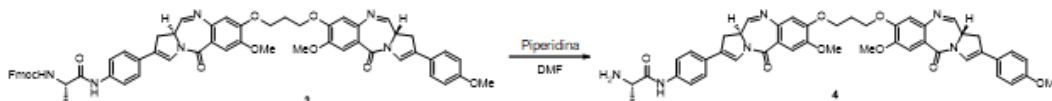


[00274] Procedimiento general para la preparación del compuesto 3:



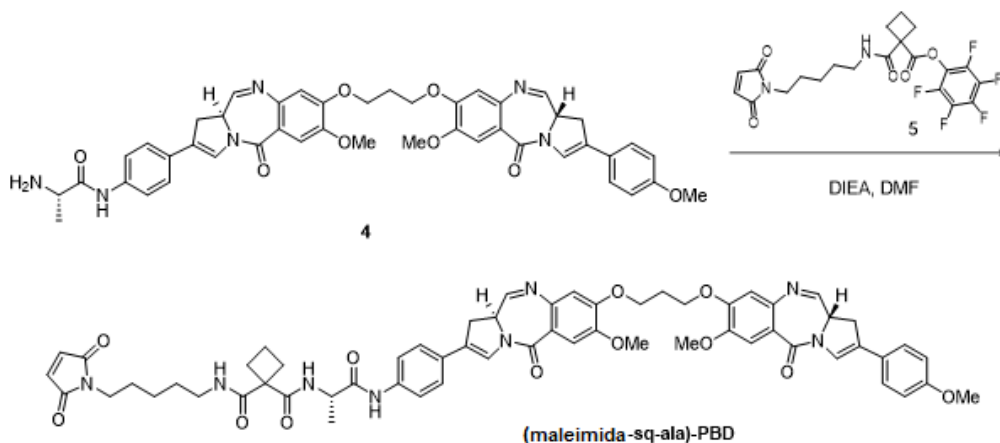
[00275] A una solución del compuesto 2 (386 mg, 1,24 mmol) en DCM (20 ml) y metanol (2 ml) se agregó EEDQ (306 mg, 1,24 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 5 min. Luego, a la solución anterior se le agregó el compuesto 1 (300,0 mg, 0,41 mmol; disponible en el comercio, por ejemplo, BOC Sciences “PBD dimer - CAS 1222490-34-7” en www.bocsci.com/product/pbd-dimer-cas-1222490-34-7-477053.html). La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 12 horas. La mezcla se concentró y se agregó metil ter-butil éter (50 ml). El sólido se recolectó y lavó con ácido metil ter-butil éter (50 ml x 2) para obtener el producto crudo del compuesto 3 (400 mg, 60 %) como un sólido amarillo, que se usó directamente para la siguiente etapa. LCMS (5-95, AB, 1,5min): $R_T = 0,838$ min, $m/z = 1019,6[M+H]^+$.

[00276] Procedimiento general para la preparación del compuesto 4:



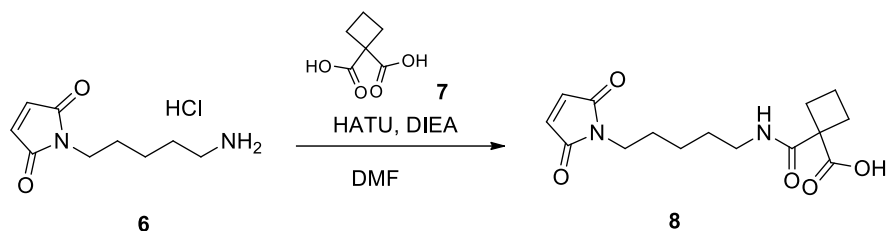
[00277] A una solución del compuesto 3 (70,0 mg, 0,07 mmol) en DMF (2 ml) se agregó piperidina (0,01ml, 0,14 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 30 min. La mezcla se concentró y se agregó metil ter-butil éter (40 ml). La mezcla se filtró para obtener un sólido, que se lavó con metil ter-butil éter (40 ml x 2) para obtener el compuesto crudo 4 (40 mg, 73 %) como un sólido amarillo. LCMS (5-95, AB, 1,5min): $R_T = 0,765$ min, $m/z = 797,4 [M+H]^+$.

[00278] Procedimiento general para el acoplamiento de precursor INT5 a la carga útil de ala-PBD:



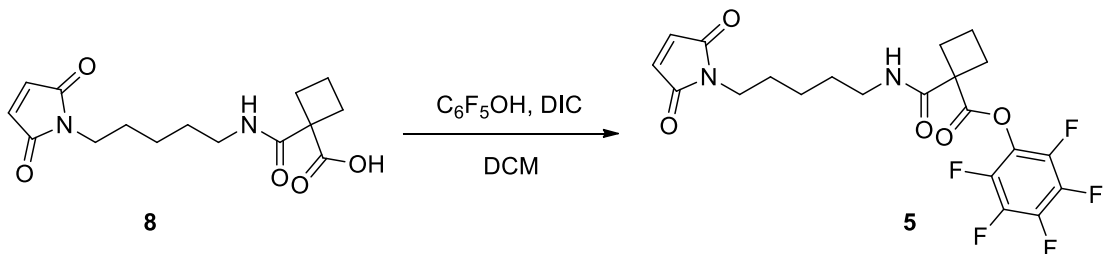
[00279] A una solución del compuesto 5 (47,6 mg, 0,1 mmol) en DMF (2ml) se agregó el compuesto 4 (40,0 mg, 0,05 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,02 ml, 0,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 2 horas. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (acetonitrilo: 40 %-70 % / 0,225 % de FA en agua) para obtener la carga útil del producto ligador X (25 mg, 46 %) como un sólido amarillo. LCMS (5-95, AB, 1,5min): RT = 0,838 min, m/z = [M+H]⁺1087,5.

[00280] Procedimiento general para la preparación del compuesto 8:



[00281] A la mezcla de ácido ciclobutan-1,1-dicarboxílico (0,82 g, 5,72 mmol) en DMF (10 ml) se agregó HATU (2,17 g, 5,72 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,22 g, 17,15 mmol), seguido de la adición de clorhidrato de 1-(5-aminopentil)pirrol-2,5-diona (1,0 g, 4,57 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora. La LCMS mostró que la reacción se completó. El solvente se eliminó al vacío y se disolvió en EtOAc (50 ml), luego se lavó con HCl ac. (60 ml, 1 mol/l) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en sílice que se eluyó con 0-5 % de alcohol de metilo en DCM para obtener el ácido 1-[5-(2,5-dioxopirrol-1-il)pentilcarbamoil]ciclobutancarboxílico (0,90 g, 64 %) como un sólido blanco. LCMS: (5-95, AB, 1,5 min), RT = 0,688 min, m/z = 308,9 [M+H]⁺; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,71 (s, 2 H), 6,37 (br s, 1 H), 3,53 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,34 – 3,31 (m, 2H), 2,68 – 2,66 (m, 2H), 2,54 – 2,51 (m, 2H), 2,11 – 1,98 (m, 2H), 1,64 – 1,57 (m, 4H), 1,32 – 1,28 (m, 2H).

[00282] Procedimiento general para la preparación del compuesto 5:



[00283] El compuesto 8 (37,0 mg, 0,12 mmol) se agregó a una solución de pentafluorofenol (33 mg, 0,18 mmol) y DIC (22,7 mg, 0,18 mmol) en DCM (5 ml) a 0 °C. La mezcla se permitió hasta 20 °C y se agitó durante 4 horas. Luego, el solvente se eliminó al vacío y se agregó EtOAc (1,5 ml) a la mezcla y el precipitado resultante se

eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró para obtener el compuesto 5 (50 mg, 69 %) como un aceite incoloro. LCMS (5-95, AB, 1,5 min): RT = 0,785min, m/z = 475,1 [M+H]⁺.

Ejemplo 9 –Caracterización de anti-Ly6E como un conjugado anticuerpo-fármaco SGD-1882 in vitro

[00284] Anti-Ly6E se conjugó con SGD-1882 esencialmente como se describió anteriormente, usando un ligador maleimida-sq-ala con un espaciador de 5 carbonos entre la maleimida y la sq. Todos los conjugados se generaron con menos de 5 % de agregado y a DAR >1,8. Las células se sembraron en placas de 384 cavidades, se cultivaron durante 24 h y se trataron con los ADC indicados, que incluyen el anticuerpo anti-Ly6E descrito previamente (9B12). Después de 5 días de incubación continua de ADC, la viabilidad celular se determinó usando el reactivo luminiscente Promega CellTiter-Glo[®]. La intensidad luminiscente se midió usando un lector PerkinElmer EnVision[®] (figura 7). La viabilidad celular relativa se calculó al normalizar con respecto al control sin tratamiento del fármaco. Anti-Ly6E muestra inactivación más potente contra la línea celular SW900 que 9B12.

Ejemplo 9 –Caracterización de anti-Ly6E como un conjugado anticuerpo-fármaco SGD-1882 (ADC) in vivo

[00285] La eficacia de los conjugados fármaco anticuerpo Ly6E se investigó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano, HCC1569X2. La línea celular HCC1569X2 se derivó en Genentech a partir de células de origen HCC1569 (ATCC) para proporcionar un crecimiento tumoral óptimo en ratones. Esta línea celular se autenticó mediante perfil de repeticiones cortas en tándem (STR) usando el sistema Promega PowerPlex[®] 16 y se comparó con perfiles de STR externos de líneas celulares para determinar el origen de la línea celular. Los estudios en animales usando esta línea celular se llevaron a cabo en Genentech de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en Genentech. Para establecer el modelo de xenoinjerto, cinco millones de células tumorales (suspendidas en 0,2 ml de HBSS con Matrigel) se inocularon en la bola adiposa mamaria torácica derecha de ratones hembras beige C.B-17 SCID (Charles River Laboratory; Hollister, CA).

[00286] Cuando los tumores alcanzaron el volumen deseado (~250 mm³), los animales se dividieron en grupos n=5 con distribución similar de volumen tumoral, y recibieron dosis intravenosa de vehículo (20 mM de acetato de histidina, 240 mM de

sacarosa, 0,02 % de polisorbato 20, pH 5,5) o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) a través de la vena de la cola. No se ocultó la información sobre el tratamiento durante la medición. Los tumores se midieron en dos dimensiones (largo y ancho) mediante el uso de calibradores y el volumen del tumor se calculó mediante el uso de la fórmula: Tamaño del tumor (mm³) = 0,5 x (largo x ancho x ancho). Se registraron cambios en los pesos corporales como un porcentaje con respecto al peso inicial. Los tamaños tumorales y pesos corporales de ratones se registraron dos veces por semana durante el curso del estudio. Los ratones cuyo volumen tumoral superó los 2000 mm³ o cuya pérdida de peso corporal fue de 20 % de su peso inicial se sometieron a eutanasia rápidamente según las directrices del IACUC.

[00287] Los datos se analizaron usando el sistema de *software* estadístico R (R Foundation for Statistical Computing; Viena, Austria), y se ajustó un modelo mixto en R usando el paquete nlme (Pinheiro *et al.*, (2013) *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed-Effects Models. R Package* versión 31-110.3.1-113). Se usaron *spline* de regresión cúbica para ajustar un perfil no lineal a los cursos de cambio de peso corporal o volumen tumoral log2 en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales luego se relacionaron con la dosis dentro del modelo mixto. Este enfoque aborda tanto las mediciones repetidas como los modestos abandonos debidos a cualquier retirada de animales no relacionada con el tratamiento antes de finalizar el estudio. Los resultados se representaron en escala natural como cambio de peso corporal ajustado o volumen tumoral de cada grupo a lo largo del tiempo (figuras 8A-8B).

Ejemplo 10 – Caracterización de anti-Ly6E como un biespecífico que se acopla a linfocitos T

[00288] Los anticuerpos biespecíficos que actúan sobre Ly6E y CD3 con brazos con afinidad alta o baja se expresaron usando los botones en ojales esencialmente como se describió. Ver Mandikian *et al.*, *Molecular cancer therapeutics* 2018, 17:776–85; Atwell *et al.*, *J Mol Biol* 1997, 270:26–35; y Ridgway *et al.*, *Protein Eng Des Sel* 1996, 9:617–21. La inactivación celular inducida por los anticuerpos biespecíficos se evaluó esencialmente como se describió anteriormente (ver, por ejemplo, Junttila *et al.*, *Canc. Res.* 2014, 74:5561-5571) usando un efector 4:1 para actuar sobre la relación con linfocitos T CD8+ y cocultivar las células durante 3 días (figuras 9A-9F). Como se esperaba, los brazos anti-CD3 de afinidad más alta correspondieron a más actividad. Anti-Ly6E probó ser superior a 9B12 a lo largo de las líneas celulares evaluadas.

Ejemplo 11 – Caracterización adicional de anti-Ly6E como un conjugado anticuerpo-fármaco SN36325

[00289] Las células se sembraron en placas de 384 cavidades, se cultivaron durante 24 h, y se trataron con los ADC indicados, que incluyen los conjugados con controles de isotipo (anti-gD y anti-CD22) y 9B12. Después de 5 días de incubación continua de ADC, la viabilidad celular se determinó usando el reactivo luminiscente Promega CellTiter-Glo®. La intensidad luminiscente se midió usando un lector PerkinElmer EnVision®. La viabilidad celular relativa se calculó al normalizar con respecto al control sin tratamiento del fármaco. Los conjugados anti-Ly6E (3A3 y 4B10) mostraron inactivación más potente contra las líneas celulares NCI-H1781 (figuras 10A-10B) y HCC1569x2 (figuras 11A-11B) que el control de isotipo, 9B12 y otros conjugados ADC. Por ejemplo, las figuras 10A-10B muestran que los anti-Ly6E quiméricos 4B10 y 3A3 muestran diferencia de potencia > 400 veces con respecto al control no diana (por ejemplo, los controles de isotipo anti-gD y anti-CD22) en comparación con solo 9 veces con 9B12 en la línea celular NCI-H1781. Las figuras 11A-11B muestran que el anti-Ly6E 3A3 quimérico muestra la potencia más alta contra la línea celular HCC1569x2, en comparación con otros ADC y control-conjugados, a pesar de una potencia general más débil con una inactivación parcial.

Ejemplo 12 – Caracterización de unión a 3A3

[00290] El día 0, las células Kuramochi se sembraron en placas portadoras celulares de 384 cavidades (Perkin Elmer) y se adhirieron durante la noche para lograr una confluencia de 80 %. Al día siguiente, las células se trataron con anticuerpos no conjugados a 2 y 20 µg/ml con medios fríos que contenían 10 µg/ml de leupeptina y 5 µM de inhibidores de proteasa pepstatina. Se permitió que los anticuerpos se unan durante 1 hora en hielo. Las células con pulsoterapias se lavaron con medios fríos que contenían inhibidores de proteasa, mientras que las células con tratamiento en curso se dejaron solas. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ humidificado durante 1 hora y 3 horas durante internalización de anticuerpo. Después de la incubación, las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído (PFA)/4 % de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT), y luego las células se lavaron seis veces con 1x PBS. Las células se bloquearon y permeabilizaron con 2 % de suero de burro que contenía 0,05 % de saponina (amortiguador de bloqueo) durante 1 hora. Se eliminó el amortiguador de bloqueo, luego se agregó el anticuerpo primario de conejo anti-LAMP1 (Sigma Aldrich, L1418) en amortiguador de bloqueo y se incubó durante la noche. Al día siguiente, las células se

lavarón seis veces con PBS que contenía 0,05 % de saponina, y luego anticuerpos secundarios anti-IgG humana 488 de burro. Solo el anti-Ly6E demostró una unión sustancialmente mayor a las células con sobreexpresión de Ly6E. Ver la figura 12A.

[00291] Además, la unión directa de fusiones de luciferasa de fragmento de unión al antígeno (Fab) a tres células que expresan Ly6E diferentes se evaluaron después de 4 horas de incubación a 4 °C. Las figuras 12B-12D mostraron que 3A3 (anti-Ly6E) tiene una unión sustancialmente mayor en líneas celulares Kuramochi (figura 12B), NCI-H1781 (figura 12C) y HCC-1569x2 (figura 12D) validadas para expresar Ly6E mediante transferencia Western. Los puntos representan el promedio de dos muestras de réplicas. La unión Fab BIAcore™ (Kd = nM) también se mostró para 3A3(218 Kd) > 2.2C2(168 Kd) > 2.2C5(63 Kd) > 1D5.3(20 Kd) > 2.5G6(14 Kd) > 1D5.2(12 Kd).

Ejemplos 13 – Colocalización

[00292] Las células Kuramochi se expusieron a cada anticuerpo a 2 µg/ml durante 1 hora a 4 °C, y los anticuerpos se lavaron para exposición por pulso (PE) o no se lavaron para exposición continua (CE), luego la colocalización e internalización (intensidad en células/intensidad en + fuera de las células) se midió a 0,1 y 3 horas a 37 °C. La figura 13 muestra que la cantidad de colocalización de 3A3 es significativamente mayor en comparación con anticuerpos 1D5.3, 2.5G6, 9B12 y control.

Ejemplo 14 – Internalización

[00293] Para evaluar las tasas de internalización, se llevó a cabo un experimento de pulso y caza en donde los anticuerpos se incubaron con células Kuramochi a 2 µg/ml durante 1 hora a 4 °C, se lavaron y la internalización se controló en el tiempo (0,1 y 3 horas). La figura 14 muestra que la velocidad de internalización para 9B12 fue más rápida en comparación con 3A3 pero la unión más alta de 3A3 produce una eficacia duradera como se observa en estudios de inactivación *in vivo*.

[00294] Si bien la invención anterior se describió de manera detallada mediante ilustraciones y ejemplos para mayor claridad, las descripciones y ejemplos no se deberían interpretar 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.