

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un anticuerpo manipulado que comprende uno o más residuos de cisteína no apareados en donde el anticuerpo manipulado se une a DLL3.
2. El anticuerpo manipulado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo manipulado comprende un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo manipulado comprende un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo injertado con CDR.
4. El anticuerpo manipulado de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el anticuerpo manipulado comprende dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, y comprende dos residuos de cisteína no apareados.
5. El anticuerpo manipulado de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque cada cadena ligera del anticuerpo comprende un residuo de cisteína no apareado.
6. El anticuerpo manipulado de conformidad con la reivindicación 5 caracterizado porque cada residuo de cisteína no apareado está en la posición C214.
7. El anticuerpo manipulado de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque cada cadena pesada del anticuerpo comprende un residuo de cisteína no apareado.
8. El anticuerpo manipulado de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque cada una de las dos cadenas pesadas es IgG1 y cada residuo de cisteína no apareado está en la posición C220.

9. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende tres CDRs de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 405 y tres CDRs de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID N°: 407.
10. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque comprende los aminoácidos 23-34 de la SEQ ID NO: 405 para CDR-L1, aminoácidos 50-56 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L2, aminoácidos 89-97 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L3, aminoácidos 26-32 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H1, aminoácidos 50-58 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H2 y aminoácidos 95-102 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H3, donde los aminoácidos están numerados de acuerdo a Chothia.
11. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque comprende los aminoácidos 30-36 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L1, aminoácidos 46-55 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L2, aminoácidos 89-96 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L3, aminoácidos 30-35 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H1, aminoácidos 47-58 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H2 y aminoácidos 93-101 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H3, donde los aminoácidos están numerados de acuerdo a MacCallum.
12. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque comprende los aminoácidos 24-34 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L1, aminoácidos 50-56 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L2, aminoácidos 89-97 de SEQ ID NO: 405 para CDR-L3, aminoácidos 31-35 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H1, aminoácidos 50-65 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H2 y aminoácidos 95-102 de SEQ ID NO: 407 para CDR-H3, donde los aminoácidos están numerados de acuerdo a Kabat.
13. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende:
 - a) Una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 389 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 391;

- b)** Una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 393 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 395;
 - c)** Una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 397 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 399;
 - d)** Una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 401 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 403; o
 - e)** Una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 405 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 407.
- 14.** El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el anticuerpo manipulado comprende
 - a)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 5 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 7;
 - b)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 5 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 8;
 - c)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 9 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 6; o
 - d)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 10 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 6.

- 15.** El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 to 13, donde el anticuerpo manipulado comprende
- a)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 11 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 7;
 - b)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 11 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 8;
 - c)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 12 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 6; o
 - d)** una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 13 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 6.
- 16.** El anticuerpo manipulado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9 a 14, caracterizado porque comprende:
- a)** una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 14 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 16; o
 - b)** una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 14 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 17.
- 17.** El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7 a 14 que comprende:
- a)** una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 18 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 15; o
 - b)** una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 19 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 15.

18. El anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo manipulado esta conjugado a, o unido a, o asociado de algún modo con un agente citotóxico por vía de uno o más residuos de cisteína libre.
19. El anticuerpo manipulado de la reivindicación 18, donde el agente citotóxico es un pirrolbenzodiazapeno (PBD).
20. Un conjugado de anticuerpo y fármaco, caracterizado porque tiene la fórmula: $Ab-[L-D]_n$ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde
 - a) Ab comprende un anticuerpo DLL3 manipulado que comprende uno o más residuos de cisteína no apareados;
 - b) L comprende un enlazador;
 - c) D comprende una PBD; y
 - d) n es un número entero de 1 a 8.
21. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 20, donde el anticuerpo manipulado DLL3 es el anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
22. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21 donde el enlazador L comprende un enlazador escindible.
23. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el enlazador escindible comprende un dipéptido.
24. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-23 donde el PBD es seleccionado de un PBD que, cuando es liberado del conjugado de anticuerpo fármaco, es PBD 5, PBD 1, PBD 2, PBD 3 o PBD 4.
25. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 24 donde el PBD es PBD5.
26. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-25, donde n es 2.

27. Un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo manipulado unido covalentemente mediante un enlazador a uno o más pirrolbenzodiazapeno(s) (PBD), donde el anticuerpo manipulado comprende uno o más residuos de cisteína no apareados, y donde el PBD es seleccionado de PBD 5, PBD 1, PBD 2, PBD 3 o PBD 4.
28. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 27, donde el anticuerpo anti-DLL3 es el anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
29. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 27 con la reivindicación 28 donde el enlazador comprende un enlazador escindible.
30. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 29 donde el enlazador escindible comprende un dipéptido.
31. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27-30, donde el PBD es PBD5.
32. El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27-31, donde el anticuerpo manipulado anti-DLL3 esta covalentemente unido a 2 PBDs.
33. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20-32 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
34. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 33 que comprende una proporción promedio un conjugado de anticuerpo y fármaco (DAR) de 2 +/-0.4.
35. La composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 33 o 34 donde la especie predominante del conjugado anticuerpo-fármaco está presente en una concentración de más del 70%.

- 36.** Un método de preparación de un conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, caracterizado porque comprende las etapas de:
- 1) proporcionar un anticuerpo DLL3 manipulado que comprende uno o más residuos de cisteína no apareados;
 - 2) reducir selectivamente el anticuerpo DLL3 manipulado; y
 - 3) conjuguar el anticuerpo DLL3 manipulado reducido selectivamente a una PBD.
- 37.** El método de conformidad con la reivindicación 36 donde el anticuerpo DLL3 manipulado es el anticuerpo manipulado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 38.** El método de las reivindicaciones 36 o 37 donde el paso de reducir selectivamente el anticuerpo DLL3 manipulado comprende el paso de contactar el anticuerpo DLL3 manipulado con un agente estabilizador.
- 39.** El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36-38 que además comprende el paso de purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco mediante cromatografía preparativa.
- 40.** Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) de fórmula: $Ab-[L-D]_n$ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:
- a)** Ab comprende un anticuerpo manipulado DLL3 que comprende uno o más residuos de cisteína no apareados;
 - b)** L comprende un enlazador escindible;
 - c)** D comprende un PBD; y
 - d)** n es un entero de 1 a 8;
- donde el ADC es seleccionado de un grupo que consiste de ADC 1, ADC 2, ADC 3, ADC 4 and ADC.
- 41.** El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 40, donde el ADC es ADC5.
- 42.** El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con la reivindicación 40 o la reivindicación 41, donde el anticuerpo manipulado DLL3 comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como

SEQ ID NO: 14 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 16.

- 43.** El conjugado de anticuerpo y fármaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40-42, donde n es 2.
- 44.** Un kit que comprende:
 - a)** uno o más recipientes que comprenden el conjugado de anticuerpo y fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 32 y 40 a 43; y
 - b)** un inserto de etiqueta o envase asociado con el uno o más recipientes, en el que el inserto de etiqueta o envase indica que el conjugado de anticuerpo y fármaco se utiliza para tratar el cáncer.
- 45.** El kit de conformidad con la reivindicación 44, donde el inserto de la etiqueta o envase asociado indica que el conjugado de anticuerpo y fármaco se utiliza para tratar cáncer de pulmón de células pequeñas.
- 46.** Un kit que comprende:
 - a)** Uno o más envases que comprende la composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-35; y
 - b)** Una etiqueta o inserto de paquete en o asociado con uno o más recipientes, donde la etiqueta o inserto de paquete indica que la composición farmacéutica es usada para tratar cáncer.
- 47.** El kit de conformidad con la reivindicación 46, donde la etiqueta o inserto de paquete indica que la composición farmacéutica es usada para tratar cáncer de pulmón de células pequeñas.