

CONJUGADOS DE FÁRMACO Y ANTICUERPO ANTI-SEZ6 Y MÉTODOS DE USO

1 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo el Título 35 del Código de los Estados Unidos § 119(e) de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/678,061, presentada el 30 de mayo de 2018, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia.

2 REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 30 de mayo de 2019, se llama 381493-703WO(167862)_SL.txt y tiene un tamaño de 28,992 bytes.

3 ANTECEDENTES TÉCNICOS

La presente solicitud se refiere a un nuevo conjugado de fármaco y anticuerpo anti-SEZ6, los componentes de este y las composiciones que lo comprenden para el tratamiento, el diagnóstico o la profilaxis del cáncer y cualquier recurrencia o metástasis de este.

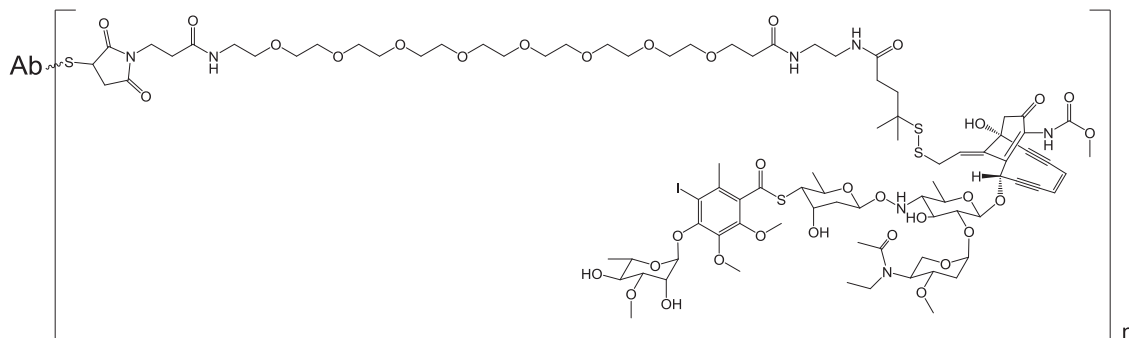
4 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diferenciación y la proliferación de las células madre y las células progenitoras son procesos normales en curso que actúan de manera concertada para apoyar el crecimiento de los tejidos durante la organogénesis, la reparación celular y el reemplazo celular. El sistema está estrictamente regulado para garantizar que solo se generen las señales adecuadas en función de las necesidades del organismo. La proliferación y la diferenciación celular ocurren normalmente solo cuando es necesario para el reemplazo de las células dañadas o que mueren o para el crecimiento. Sin embargo, la interrupción de estos procesos puede provocarse por muchos factores, que incluyen la insuficiencia o la sobreabundancia de varios productos químicos de señalización, la presencia de microentornos alterados, las mutaciones genéticas o una combinación de estos. La interrupción de la proliferación y/o la diferenciación celular normal puede conducir a diversos trastornos, que incluyen las enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Los tratamientos terapéuticos convencionales para el cáncer incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia. A menudo, estos tratamientos son ineficaces y la resección quirúrgica puede no proporcionar una alternativa clínica viable. Las limitaciones en el nivel de atención actual son particularmente evidentes en aquellos casos en los que los pacientes se someten a tratamientos de primera línea y posteriormente recaen. En tales casos, los tumores resistentes, a menudo agresivos e incurables, surgen con frecuencia. Las tasas de supervivencia general de muchos tumores se han mantenido prácticamente sin cambios a lo largo de los años debido, al menos en parte, al fracaso de las terapias existentes para prevenir la recaída, la recurrencia del tumor y la metástasis. Por tanto, sigue existiendo una gran necesidad de desarrollar terapias más dirigidas y potentes para los trastornos proliferativos. La presente invención aborda esta necesidad.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto amplio, la presente invención proporciona un conjugado de fármaco y anticuerpo, o las composiciones de este, que se une específicamente a los determinantes de SEZ6 humana. En determinadas modalidades, el determinante de SEZ6 es una proteína SEZ6 expresada en las células tumorales mientras que en otras modalidades el determinante de SEZ6 se expresa en las células iniciadoras de tumores. En una modalidad preferida, el conjugado de fármaco y anticuerpo de SEZ6 comprenderá:

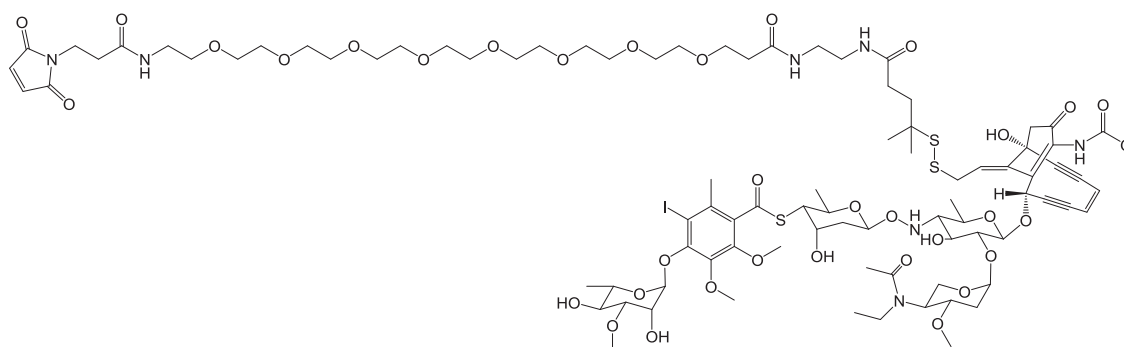


Fórmula I

en donde el Ac comprende un anticuerpo anti-SEZ6 que tiene una cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 y en donde n es 2. A los efectos de la presente descripción, este conjugado de fármaco y anticuerpo se denominará “ADC1 hSEZ6-1.ss1” a menos que se indique de cualquier otra manera.

En modalidades seleccionadas, la presente invención comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 4. En determinados aspectos, la invención comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada (SEQ ID NO: 3) o una cadena ligera (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo anti-SEZ6 de la invención o un fragmento de este. En otras modalidades, la invención comprende un vector que comprende uno o más de los ácidos nucleicos descritos anteriormente o una célula huésped que comprende dichos ácidos nucleicos o vectores.

En otra modalidad más, la invención comprende un enlazador del fármaco calicheamicina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, que comprende la estructura que se expone en la Fórmula II.



Fórmula II

Como se expuso anteriormente, la presente invención proporciona un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-SEZ6 en donde el anticuerpo se conjuga con una o más cargas útiles de calicheamicina no escindibles de la Fórmula II. Se proporcionan además las composiciones farmacéuticas que comprenden un ADC anti-SEZ6 como se describe en la presente descripción. En determinadas modalidades, las composiciones comprenderán una relación de fármaco a anticuerpo seleccionada (DAR) en la que la especie de ADC predominante (por ejemplo, que comprende 2 cargas de calicheamicina) comprende más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 90 % o más de aproximadamente el 95 % de las especies presentes. Preferentemente, la carga del fármaco de la especie predominante será 2.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar el cáncer que comprende administrar un conjugado de fármaco y anticuerpo o una composición farmacéutica

como las que se describen en la presente descripción a un sujeto que lo necesite. En determinadas modalidades, el sujeto sufrirá cáncer de pulmón y, en modalidades seleccionadas, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

En otras modalidades, el ADC que se describe comprenderá un margen de seguridad (derivado como se describe en la presente descripción) superior a 6. En otras modalidades, el margen de seguridad será mayor que 7 y en otras modalidades más el margen de seguridad será mayor que 8 o mayor que 9. En otras modalidades más, el margen de seguridad será de aproximadamente 10.

En otra modalidad más, la invención comprende un método para reducir las células iniciadoras de tumores en una población de células tumorales, en donde el método comprende poner en contacto (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*) una población de células iniciadoras de tumores con un conjugado de fármaco y anticuerpo como se describe en la presente descripción, por lo que se reduce la frecuencia de las células iniciadoras de tumores.

En un aspecto, la invención comprende un método para administrar una citotoxina a una célula que comprende poner en contacto la célula con el conjugado de fármaco y anticuerpo descrito.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona los kits o los dispositivos y los métodos asociados que son útiles en el tratamiento del cáncer de pulmón. Con este fin, la presente invención preferentemente proporciona un artículo de fabricación útil para tratar el cáncer de pulmón que comprende un receptáculo que contiene el ADC contra SEZ6 y los materiales instructivos para usar el ADC para tratar el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer de pulmón de células pequeñas) o proporciona un régimen de dosificación para el mismo. En otras modalidades, los kits que se describen comprenderán las instrucciones, las etiquetas, los prospectos, los textos o similares que indiquen que el kit o el dispositivo se usa para el tratamiento del cáncer de pulmón o proporcionará un régimen de dosificación para el mismo.

Lo anterior es un resumen y por lo tanto contiene, por necesidad, simplificaciones, generalizaciones y omisiones de los detalles; en consecuencia, los expertos en la técnica apreciarán que el resumen es solo ilustrativo y no pretende ser limitante de ningún modo. Otros aspectos, características y ventajas de los métodos, las composiciones y/o los dispositivos y/u otros temas que se describen en la presente descripción resultarán evidentes en las enseñanzas que se exponen en la presente descripción. El resumen se proporciona para presentar una selección de conceptos en

una forma simplificada que se describen con más detalle a continuación en la Descripción detallada.

6 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una representación esquemática de ADC1 hSEZ6-1.ss1;

La Figura 2 proporciona las curvas de unión que demuestran que un anticuerpo de SEZ6 que comprende la mutación S60N tiene un perfil de afinidad que es sustancialmente igual que un anticuerpo SEZ6 sin la mutación S60N;

La Figura 3 demuestra que los ADC contra SEZ6 descritos destruyen eficazmente las células que expresan hSEZ6 de una manera dependiente de la dosis sin eliminar las células de control vírgenes que no expresan hSEZ6;

Las Figuras 4A y 4B representan la capacidad de los ADC contra SEZ6 descritos para retardar el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón de células pequeñas en ratones inmunodeprimidos implantados con SCLC LU 95 (Figura 4A) y SCLC LU 149 (Figura 4B); y

Las Figuras 5A – 5D demuestran que los tumores de SCLC son particularmente susceptibles al tratamiento con los ADC que comprenden el fármaco y el enlazador de calicheamicina no escindible en donde las Figuras 5A y 5B muestran, respectivamente, los niveles de expresión relativa de SEZ6 y un antígeno de control positivo en varias líneas de células tumorales, la Figura 5C muestra que una toxina PBD destruye uniformemente diferentes tipos de células cancerosas y la Figura 5D muestra que la calicheamicina está particularmente activa en la destrucción de las células de SCLC.

7 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente descripción se describen las modalidades ilustrativas no limitantes de la invención que ejemplifican los principios de esta. Los títulos de las secciones usados en la presente descripción son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación del tema que se describe. Para los fines de la presente descripción todos los números de acceso de las secuencias de identificación pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de referencia de NCBI (RefSeq) y/o la base de datos de secuencias de archivos de NCBI GenBank® a menos que se indique de cualquier otra manera.

La presente invención proporciona nuevos ADC anti-SEZ6 y los componentes de estos (que incluyen el anticuerpo hSEZ6-1.ss1 y el enlazador del fármaco calicheamicina de la Fórmula II) que comprenden un agente de dirección del anticuerpo anti-SEZ6

específico de sitio y una carga útil citotóxica de calicheamicina. Como se discute con más detalle a continuación y se expone en los ejemplos adjuntos, el ADC anti-SEZ6 descrito es particularmente eficaz para suprimir el crecimiento tumoral cuando se compara con otros ADC anti-SEZ6.

La capacidad para reducir o eliminar eficazmente las células madre cancerosas y/o el tumor mediante el uso del ADC contra SEZ6 descrito en la presente descripción se debe a la relativa falta de toxicidad fuera de la diana que permite un aumento de la dosis. Esto, a su vez, proporciona niveles más altos de calicheamicinas en el sitio del tumor que otros ADC de calicheamicinas y da como resultado una mayor destrucción de células. Como se muestra en los ejemplos adjuntos, el aumento de la concentración de toxinas en el sitio del tumor proporciona una supresión prolongada del tumor en ratones inmunodeprimidos. Por lo tanto, el ADC contra SEZ6 descrito en la presente descripción probablemente exhibirá un índice terapéutico favorable y puede usarse en el tratamiento y/o la prevención de trastornos proliferativos seleccionados tales como el cáncer de pulmón de células pequeñas o la progresión o la recurrencia de este.

Células madre cancerosas con SEZ6

Se ha postulado que el SCLC es de origen broncogénico y surge en parte de las células neuroendocrinas pulmonares (Galluzzo y Bocchetta, 2011; PMID: 21504320). Cualquiera que sea la fuente celular de origen de estos tumores, está claro que muestran un fenotipo endocrino poco diferenciado, a menudo son altamente proliferativos y agresivos, y con frecuencia sobreexpresan proteínas neuronales. La elevación resultante de los marcadores de expresión neuronales en estos tumores, que de otro modo podrían estar restringidos principalmente al sistema nervioso o mostrar una expresión limitada durante el desarrollo, de los cuales SEZ6 puede ser un ejemplo, puede por lo tanto ofrecer una diana terapéutica única para los tumores con el fenotipo neuroendocrino.

La expresión de SEZ6 se asocia con varias subpoblaciones de células tumorigénicas de una manera que las hace susceptibles al tratamiento como se expone en la presente descripción. En este aspecto, la invención proporciona el ADC1 hSEZ6-1.ss1 que puede ser particularmente útil para dirigirse a las células tumorigénicas, lo que facilita de esta manera el tratamiento, el manejo y/o la prevención del cáncer. Ya sea por la inhibición o la eliminación de las células tumorigénicas, la modificación de su potencial (por ejemplo, por diferenciación inducida o interrupción específica) o la interferencia de otro modo con la capacidad de las células tumorigénicas para influir en

el entorno del tumor u otras células, la presente invención permite un tratamiento más eficaz del cáncer al inhibir la tumorigénesis, el mantenimiento del tumor y/o la metástasis y la recurrencia. Se apreciará además que las mismas características de los anticuerpos descritos los hacen particularmente eficaces en el tratamiento de tumores recurrentes que han demostrado ser resistentes a los regímenes de tratamiento estándar.

Los métodos que pueden usarse para evaluar una reducción en la frecuencia de las células tumorigénicas incluyen, pero no se limitan a, el análisis citométrico o inmunohistoquímico, preferentemente por el análisis por dilución límite *in vitro* o *in vivo* (Dylla y otros, 2008, PMID: PMC2413402 y Hoey y otros, 2009, PMID: 19664991).

Por tanto, la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para reducir la frecuencia de las células tumorigénicas puede determinarse mediante el uso de las técnicas y los marcadores conocidos en la técnica. En algunos casos, los ADC anti-SEZ6 pueden reducir la frecuencia de las células tumorigénicas en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o incluso en un 35 %. En otras modalidades, la reducción en la frecuencia de las células tumorigénicas puede estar en el orden del 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o 65 %. En determinadas modalidades, los compuestos descritos pueden reducir la frecuencia de las células tumorigénicas en un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o incluso 95 %. Se apreciará que cualquier reducción de la frecuencia de las células tumorigénicas probablemente resulte en una reducción correspondiente en la tumorigenicidad, la persistencia, la recurrencia y la agresividad de la neoplasia.

Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos y las variantes y los derivados de estos, incluida la nomenclatura aceptada y los sistemas de numeración, se han descrito extensamente, por ejemplo, en Abbas y otros (2010), *Cellular and Molecular Immunology* (6ª Edición), W.B. Saunders Company; o Murphey y otros (2011), *Janeway's Immunobiology* (8ª Edición), Garland Science.

Un “anticuerpo” o “anticuerpo intacto” se refiere típicamente a una proteína tetramérica en forma de Y que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos ligeras (L) unidas por enlaces disulfuro covalentes e interacciones no covalentes. Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). Cada cadena pesada comprende un dominio variable (VH) y una región constante, que en el caso de los anticuerpos IgG, IgA e IgD, comprende tres dominios denominados CH1, CH2 y CH3 (IgM e IgE tienen un cuarto dominio, CH4). En las clases de IgG, IgA e IgD, los dominios CH1 y CH2 están separados por una región de

bisagra flexible, que es un segmento rico en prolina y cisteína de longitud variable (de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos en varias subclases de IgG). Los dominios variables tanto en la cadena ligera como en la pesada están unidos a los dominios constantes por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos y la cadena pesada también tiene una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos adicionales. Cada clase de anticuerpo comprende además enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios formados por residuos de cisteína emparejados.

Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" incluye específicamente los anticuerpos monoclonales IgG1 humanizados que comprenden las cadenas ligeras kappa (κ).

Los dominios variables de los anticuerpos muestran una variación considerable en la composición de aminoácidos de un anticuerpo a otro y son los principales responsables del reconocimiento y la unión al antígeno. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo de manera que un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión (es decir, es bivalente). Los dominios VH y VL comprenden tres regiones de variabilidad extrema, que se denominan regiones hipervariables, o más comúnmente, regiones determinantes de complementariedad (CDR), enmarcadas y separadas por cuatro regiones menos variables conocidas como regiones marco (FR). La asociación no covalente entre la región VH y VL forma el fragmento Fv ("fragmento variable") que contiene uno de los dos sitios de unión al antígeno del anticuerpo.

Como se usa en la presente descripción, la asignación de los aminoácidos a cada dominio, la región marco y la CDR estará de acuerdo con uno de los esquemas proporcionados por Kabat y otros, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5ª Edición), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publicación núm. 91-3242; Chothia y otros, 1987, PMID: 3681981; Chothia y otros, 1989, PMID: 2687698; MacCallum y otros, 1996, PMID: 8876650; o Dubel, Ed. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 3ª Edición, Wiley-VCH Verlag GmbH y Co o AbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopia) a menos que se indique de cualquier otra manera. Como se conoce bien en la técnica, la numeración de los residuos de la región variable es típicamente como se establece en Chothia o Kabat. Los residuos de aminoácidos que comprenden las CDR según se definen por Kabat, Chothia, MacCallum (también conocido como Contact) y AbM según se obtienen de la base de

datos del sitio web de Abysis (abajo) se establecen a continuación en la Tabla 1. Tenga en cuenta que MacCallum usa el sistema de numeración de Chothia.

TABLA 1

	Kabat	Chothia	MacCallum	AcM
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	52-56	47-58	50-58
VH CDR3	95-102	95-102	93-101	95-102
VL CDR1	24-34	24-34	30-36	24-34
VL CDR2	50-56	50-56	46-55	50-56
VL CDR3	89-97	89-97	89-96	89-97

Las regiones variables y las CDR en una secuencia de anticuerpo pueden identificarse de acuerdo con las reglas generales que se han desarrollado en la técnica (por ejemplo, como se establece anteriormente) o mediante la alineación de las secuencias con una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones se describen en Kontermann y Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001 y Dinarello y otros, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley y Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos ilustrativas de las secuencias de anticuerpos se describen y puede accederse a ellas a través del sitio web “Abysis” en www.bioinf.org.uk/abs (mantenido por A.C. Martin en el Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, Londres, Inglaterra) y el sitio web de VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter y otros, *Nucl. Acids Res.*, 33 (Edición de la base de datos): D671-D674 (2005).

Preferentemente, las secuencias se analizan mediante el uso de la base de datos de Abysis, que integra los datos de las secuencias de Kabat, IMGT y Protein Data Bank (PDB) con los datos estructurales de PDB. Vea el capítulo del libro del Dr. Andrew C. R. Martin *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, también disponible en el sitio web

bioinforg.uk/abs). El sitio web de la base de datos de Abysis incluye además reglas generales que se han desarrollado para identificar las CDR que pueden usarse de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción. A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las CDR establecidas en la presente descripción se derivan de acuerdo con el sitio web de la base de datos de Abysis según Kabat y otros.

Para las posiciones de los aminoácidos de la región constante de la cadena pesada que se discuten en la invención, la numeración se realiza de acuerdo con el índice Eu descrito por primera vez en Edelman y otros, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1): 78-85 que describe la secuencia de aminoácidos de la proteína Eu de mieloma, que según se informa, fue la primera IgG1 humana secuenciada. El índice Eu de Edelman también se establece en Kabat y otros, 1991 (arriba). Por lo tanto, los términos “índice Eu como se establece en Kabat” o “índice Eu de Kabat” o “índice Eu” o “numeración Eu” en el contexto de la cadena pesada se refieren al sistema de numeración de los residuos basado en el anticuerpo Eu IgG1 humano de Edelman y otros, como se establece en Kabat y otros, 1991 (arriba). El sistema de numeración usado para la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera se establece de forma similar en Kabat y otros (arriba).

Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de la región constante de la cadena ligera y pesada del anticuerpo hSEZ6-1.ss1 se han diseñado como se describe en la presente descripción para proporcionar cisteínas no emparejadas. Estas regiones constantes están entonces operativamente asociadas con las regiones variables de la cadena pesada y ligera descritas mediante el uso de las técnicas estándar de biología molecular para proporcionar las cadenas del anticuerpo de longitud completa que se incorporan en el hSEZ6-1.ss1 descrito.

Generación y producción de anticuerpos

El anticuerpo humanizado hSEZ6-1.ss1 se produce como se expone en los Ejemplos 1 y 2 adjuntos a la presente y las secuencias de aminoácidos resultantes de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa se exponen inmediatamente a continuación como la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. Como se analiza a continuación, la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende una mutación S60N diseñada para inactivar un sitio de glicosilación y una mutación C220S (numerada de acuerdo con el índice EU de Kabat) que proporciona la cisteína libre en la cadena ligera. Tenga en cuenta que en la cadena pesada las mutaciones S60N y C220S están subrayadas, mientras que en la cadena ligera la cisteína libre resultante

en la posición 214 está subrayada. La región variable de ambas cadenas se muestra en negrita.

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSSWINWVRQMPGKGLEWMGRIYPGE
GDTNY**NGNFEGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCTRGLVMDYWGGTL**
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 3)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQAPRLLIYAASN
VQSGIPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLEPEDFAVYYCQQSIEDPPTFGGGTKVEIKRTVA**
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 4)

Además, las secuencias de ácido nucleico compatibles que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa mencionadas anteriormente se exponen inmediatamente a continuación como la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente.

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE LA CADENA PESADA (con intrones)

gaagtccaactcgtccaatccggtgccgaagtgaagaaagcctgggaatccctgaagatcagctgcaagggatccggt
tactcgttcacctcctcctggttaactgggtccggcagatgcccgaaaggactggagtggatgggcagaatctatcc
ggggaagggggacactaattacaacggaaactcgagggccaggtcaccatttcggccgataagagcatctcaaccg
cgtacttgagtggtcaagcctgaaggctccgacaccgccatgtactactgtactcgccgcttgatggactactggg
gacagggaaactctcgtgaccgtgtcgtccgcctctaccaagggcccttcggtgtccctctggccccctcgagcaagagc
acctctgggggcacagcggccctgggctgctgtgcaaggactactccccgagccggtgacggtgctgtggaactcag
gcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccgctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc
gtgccctccagcagcttgggcacccagacctatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaa
gaaagtggtgagaggccagcacagggaggagggtgtctgtggaagccaggctcagcgtcctgctgagcgcacat
cccggtatgcagccccagtcaggccagcaaggcaggccccgtctgctcttaccggaggcctctgcccggccca
ctcatgctcaggagagggtcttctggcttttccccaggctctgggcaggcacaggctagggtcccctaaccaggccct
gcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctgccaagagccatatccgggaggacctgcccctgacctaaagcc
caccacaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctcctccagattccagtaactcccaatcttctct
gcagagcccaaatctagtgcacaaactcacacatgccaccgtgccaggaagccagcccaggcctcgccctcag

ctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccaggggacaggccccagccgggtgctgacacgtccacctcc
atctcttctcagcacctgaactcctgggggaccgtcagctcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatct
cccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtgg
acggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgt
cctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaaagccctcccagccc
ccatcgagaaaaccatctcaaagccaaaggtgggacccgtgggtgagaggccacatggacagaggccggctc
ggccacccctctgccctgagagtaccgtgtaccaacctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtac
accctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgtaaaggcttctatcccagcg
acatcgccgtggagtgggagagcaatgggagcgggagagaacaactacaagaccacgcctcccgctggtgactccga
cggctccttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgtccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

(SEQ ID NO: 5)

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DE LA CADENA LIGERA

gaaatcgtgtgaccagtccccgctaccctgtcactgagccccggagaacgcgcgactctgtcctgccgggcatccc
agtccgtggactacaacggaatctctacatgcactggtatcagcaaaagccaggccaagccccgagactgtcatcta
cgccgcctcgaacgtgcagagcgggtattccggcgcggttctccggctcgggcagcggaaaccgattttaccctcactatct
cgctactgaacctgaggacttcgccgtgtactactgccagcagtcattgaggaccgcctactttcggggggggaacc
aaagtcgagatcaagcggactgtggctgcaccaagtgtcttcatcttccgccatctgatgagcagttgaaatctggaact
gcctctgtgtgctcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataacgcctccaatcg
ggtaactcccaggagaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgtgacgtg
agcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaa
agagcttcaacaggggagagtgt

(SEQ ID NO: 6)

El componente del anticuerpo de SEZ6 de la presente invención se ha diseñado para facilitar la conjugación eficaz de la toxina calicheamicina. En este aspecto, las preparaciones del conjugado de fármaco y anticuerpo (ADC) de la invención comprenden una población relativamente homogénea de moléculas de ADC tanto en términos de la posición de la citotoxina en el anticuerpo como de la relación de fármaco a anticuerpo (DAR). Sobre la base de la presente descripción, un experto en la técnica podría fabricar fácilmente el constructo diseñado específico de sitio descrito, que comprende las SEQ ID NO: 3 y 4. Como se usa en la presente descripción, un “anticuerpo específico de sitio” o “constructo específico de sitio” significa un anticuerpo en donde al menos un aminoácido de la cadena pesada o ligera se elimina, altera o sustituye (preferentemente con otro aminoácido) para proporcionar al menos una cisteína libre. De manera similar, un “conjugado específico de sitio” se considerará un

ADC que comprende un anticuerpo específico de sitio y al menos una citotoxina conjugada con la cisteína o las cisteínas libres o no emparejadas. En la presente invención, la cisteína en la posición 220 de la cadena pesada (numeración Eu de Kabat) se ha mutado a una serina, lo que interrumpió de esta manera el puente disulfuro que se forma de manera natural con la cisteína terminal en la posición 214 de la región constante de la cadena ligera kappa. Esto convierte a la cisteína en la posición 214 en una cisteína libre o no emparejada de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción que luego se conjuga con el enlazador del fármaco calicheamicina descrito.

Como se usa en la presente descripción, los términos “cisteína libre” o “cisteína no emparejada” pueden usarse indistintamente a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera y significarán un constituyente de cisteína (o tiol que contiene) (por ejemplo, un residuo de cisteína) de un anticuerpo, ya sea presente de manera natural o incorporado específicamente en una posición seleccionada del residuo mediante el uso de las técnicas de ingeniería molecular, que no es parte de un enlace disulfuro de origen natural (o “nativo”) en condiciones fisiológicas. En modalidades seleccionadas, la cisteína libre puede comprender una cisteína de origen natural cuya pareja del puente disulfuro intercatenario o intracatenario nativo se ha sustituido, eliminado o alterado de otro modo para interrumpir el puente disulfuro de origen natural en condiciones fisiológicas, lo que hace que la cisteína no emparejada sea adecuada para la conjugación específica de sitio. Se apreciará que, antes de la conjugación, las cisteínas libres o no emparejadas pueden estar presentes como un tiol (cisteína reducida), como una cisteína protegida (oxidada) o como parte de un enlace disulfuro intra o intermolecular no nativo (oxidado) con otra cisteína o grupo tiol en la misma o diferente molécula dependiendo del estado de oxidación del sistema. Como se analiza con más detalle a continuación, la reducción leve del constructo de anticuerpo diseñado de forma apropiada proporcionará los tioles disponibles para la conjugación específica de sitio. Por consiguiente, en modalidades particularmente preferidas, las cisteínas libres o no emparejadas estarán sujetas a la reducción selectiva y posterior conjugación para proporcionar composiciones con una DAR homogénea. Las posiciones de los residuos que ya no están “libres” o “no emparejados” pueden denominarse “sitios diseñados de conjugación” una vez que se unen covalentemente al enlazador del fármaco.

Los anticuerpos y los fragmentos de estos pueden producirse o modificarse mediante el uso del material genético obtenido de las células productoras de anticuerpos y la

tecnología recombinante (ver, por ejemplo; Dubel y Reichert (Eds.) (2014) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 2ª Edición, Wiley-Blackwell GmbH; Sambrook y Russell (Eds.) (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Edición), NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel y otros, (2002) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John y Sons, Inc.; y el documento núm. U.S.P.N. 7,709,611).

Otro aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se “aísla” o se vuelve sustancialmente puro cuando se separa de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, la formación de bandas de CsCl, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel de agarosa y otros que se conocen bien en la técnica. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, el ADN (por ejemplo, ADN genómico, ADNc), el ARN y las variantes artificiales de estos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos), ya sean monocatenarios o bicatenarios y pueden o no contener intrones. En modalidades seleccionadas, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse mediante el uso de las técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados como se describe en los ejemplos siguientes), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar o las técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulinas (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de presentación en fagos), las moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo pueden recuperarse de la biblioteca.

Los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL pueden manipularse adicionalmente mediante las técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes de los fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, como una región constante del anticuerpo o un enlazador flexible. El término “unido operativamente”, como se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN se unen de

manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3 en el caso de IgG1). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, y otros (1991) (arriba)) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, y otros (1991) (arriba)) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero con la máxima preferencia es una región constante kappa.

En cada caso, los dominios VH o VL pueden estar unidos operativamente a sus respectivas regiones constantes (CH o CL), donde las regiones constantes son regiones constantes específicas de sitio y proporcionan un anticuerpo específico de sitio. En modalidades seleccionadas, el anticuerpo específico de sitio resultante comprenderá dos cisteínas no emparejadas en el dominio CL.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por consiguiente, las líneas celulares que expresan de manera estable el anticuerpo seleccionado pueden diseñarse mediante el uso de las técnicas estándar reconocidas en la técnica y forman parte de la invención. En lugar de usar los vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Puede usarse cualquiera de los sistemas de selección que se conocen bien en la técnica, incluido el sistema de expresión del gen de glutamina sintetasa (el sistema GS) que proporciona un enfoque eficaz para potenciar la expresión en condiciones seleccionadas. El sistema GS se describe en su totalidad o en parte en

relación con los documentos núms. EP 0 216 846, EP 0 256 055, EP 0 323 997 y EP 0 338 841 y U.S.P.N. 5,591,639 y 5,879,936. Otro sistema de expresión compatible para el desarrollo de líneas celulares estables es el kit Freedom™ CHO-S (Life Technologies).

Una vez que se ha producido un anticuerpo de la invención mediante la expresión recombinante o cualquier otra de las técnicas descritas, puede purificarse o aislarse mediante los métodos conocidos en la técnica en los que se identifica y se separa y/o se recupera de su entorno natural y se separa de los contaminantes que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo o el ADC relacionado. Los anticuerpos aislados incluyen los anticuerpos *in situ* dentro de las células recombinantes.

Estas preparaciones aisladas pueden purificarse mediante el uso de diversas técnicas reconocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, la diálisis, la diafiltración y la cromatografía de afinidad, particularmente la cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G.

Conjugados de anticuerpos

Como se discutió anteriormente, el anticuerpo de la invención se conjuga con dos toxinas calicheamicinas para formar un “conjugado de fármaco y anticuerpo” (ADC) o “conjugado de anticuerpo”. El término “conjugado” se usa ampliamente y significa la asociación covalente de una calicheamicina con el anticuerpo de la presente invención. En la presente descripción, la asociación se efectúa a través de los residuos de cisteína en la posición 214 de las regiones constantes de la cadena ligera.

Se apreciará que los ADC de la presente invención pueden usarse para administrar selectivamente las cargas de calicheamicina predeterminadas a las células tumorigénicas y/o las células que expresan SEZ6. Como se establece en la presente descripción, los términos “fármaco” o “carga” pueden usarse indistintamente y significarán una molécula de calicheamicina. Una “carga útil” comprende la calicheamicina en combinación con un compuesto enlazador no escindible que proporciona un complejo farmacéutico estable hasta que el ADC alcanza la diana. La Fórmula II (expuesta anteriormente) es una carga útil ilustrativa con una carga de calicheamicina.

En modalidades preferidas, el ADC que se describe dirigirá la carga útil unida (por ejemplo, la Fórmula II) al sitio diana en un estado no tóxico, relativamente no reactivo, antes de liberar y activar la toxina calicheamicina. Esta liberación dirigida de la carga se logra preferentemente a través de la conjugación estable de las cargas útiles y una

composición relativamente homogénea de las preparaciones de ADC que minimizan las especies de ADC tóxicas sobreconjugadas. Junto con un enlazador del fármaco no escindible, particularmente estable, que se diseña para liberar la carga tras la administración al sitio del tumor, los conjugados de la presente invención pueden reducir sustancialmente la toxicidad no específica indeseable. Esto proporciona ventajosamente niveles relativamente altos de la citotoxina activa en el sitio del tumor al tiempo que minimiza la exposición de las células y los tejidos no diana, lo que proporciona de esta manera una eficacia mejorada.

El conjugado de la presente invención puede representarse generalmente por la Fórmula III:

Ac-n

en donde:

- a) Ac comprende un anticuerpo anti-SEZ6 que tiene una cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 4;
- b) comprende el fármaco y el enlazador de la Fórmula II unido covalentemente al Ac; y
- c) n es 2.

En algunas modalidades preferidas, la presente invención comprende la conjugación selectiva de la carga útil de calicheamicina con las cisteínas libres mediante el uso de agentes estabilizantes en combinación con agentes reductores suaves como se describe en la presente descripción. Tales condiciones de reacción tienden a proporcionar preparaciones más homogéneas con menos conjugación y contaminantes inespecíficos y, en consecuencia, menos toxicidad.

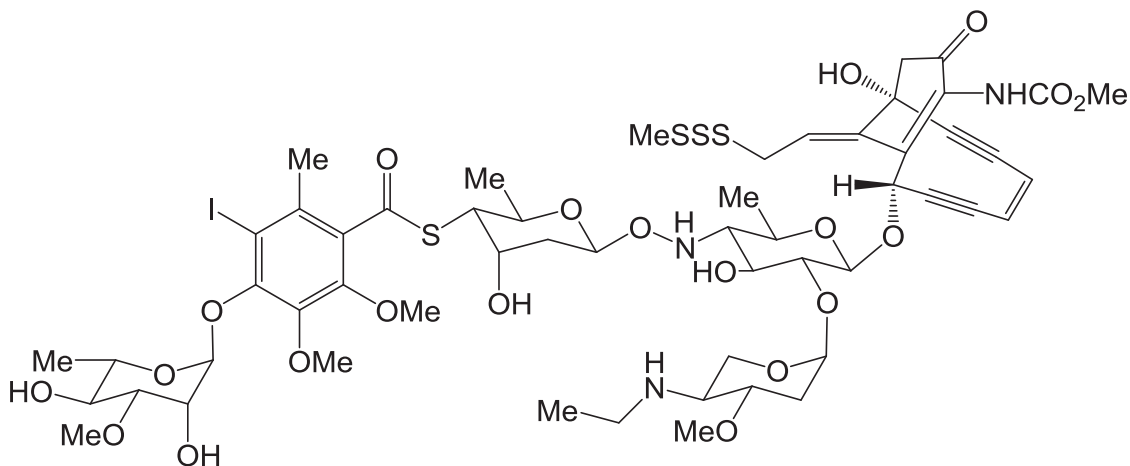
Carga de calicheamicina

Como se analiza en la presente descripción, los anticuerpos de la invención se conjugan con una toxina calicheamicina. Es decir, el ADC contra SEZ6 que se describe en la invención puede comprender la fórmula Ac-n (Fórmula III) o una sal farmacéuticamente aceptable de este en donde D es la calicheamicina o un análogo de esta en cualquiera de las estructuras moleculares proporcionadas en la presente descripción. Como se conoce en la técnica, las calicheamicinas son una clase de antibióticos antitumorales enediino derivadas de la bacteria Micromonospora echinospora, que incluyen la calicheamicina γ_1^I , la calicheamicina β_1^{Br} , la calicheamicina γ_1^{Br} , la calicheamicina α_2^I , la calicheamicina α_3^I , la calicheamicina β_1^I y la calicheamicina δ_1^I que se aislaron y se caracterizaron. Las estructuras de cada uno de los análogos de calicheamicina anteriores se conocen bien en la técnica (por ejemplo, ver Lee y otros, Journal of Antibiotics, julio de 1989, que se incorpora en la

presente descripción como referencia en su totalidad) y son compatibles con los constructos de enlazador y fármaco calicheamicina y los conjugados de fármaco y anticuerpo que se describen en la presente descripción.

En general, la calicheamicina γ^1 contiene dos regiones estructurales distintas, cada una desempeña un papel específico en la actividad biológica del compuesto. La mayor de las dos consiste en un residuo de azúcar extendido, que comprende cuatro unidades de monosacárido y un anillo de benceno hexasustituido; estos se unen a través de una serie muy inusual de enlaces glicosídicos, tioéster e hidroxilamina. La segunda región estructural, la aglicona (conocida como calicheamicinona), contiene un núcleo bicíclico compacto y altamente funcionalizado, que alberga una unidad de enediino tensada dentro de un anillo de puente de 10 miembros. Esta subunidad de aglicona comprende además un trisulfuro alílico que, como se describe a continuación, funciona como un activador para generar la forma citotóxica de la molécula.

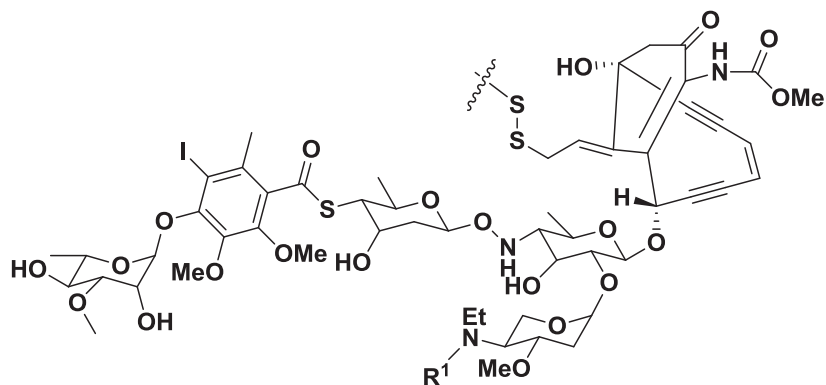
A modo de ejemplo, la estructura del trisulfuro de la calicheamicina γ^1 se muestra inmediatamente a continuación en la Fórmula IV:



Fórmula IV

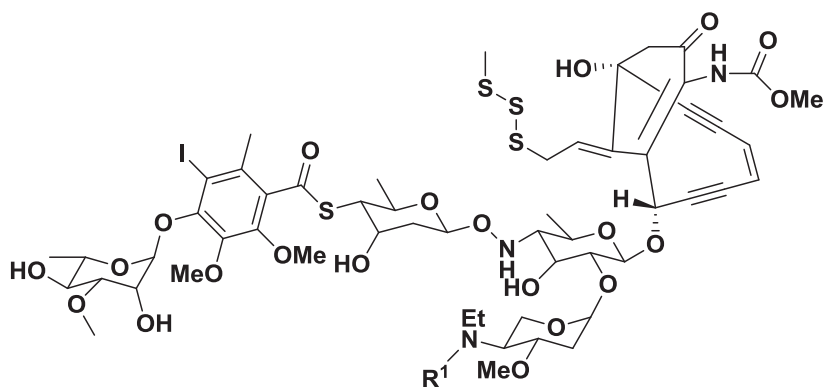
Como se usa en la presente descripción, el término “calicheamicina” debe entenderse que significa cualquiera de la calicheamicina γ^1 , la calicheamicina β_1^{Br} , la calicheamicina γ_1^{Br} , la calicheamicina α_2^1 , la calicheamicina α_3^1 , la calicheamicina β_1^1 y la calicheamicin δ_1 junto con los derivados de N-acetilo, los análogos de sulfuro y los análogos de estos. En consecuencia, como se usa en la presente descripción, se entenderá que el término “calicheamicina” abarca cualquier calicheamicina encontrada en la naturaleza, así como también las moléculas de calicheamicina con un resto disulfuro que tiene un punto de unión a otra molécula (por ejemplo, un conjugado de

fármaco y anticuerpo) y los análogos de esta. A modo de ejemplo, como se usa en la presente descripción, debe entenderse que la calicheamicina γ^I comprende las siguientes moléculas:



Fórmula V

y



Fórmula VI

en donde R¹ se define como a continuación.

Se apreciará que cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente es compatible con las enseñanzas en la presente descripción y puede usarse para fabricar los constructos de enlazador y fármaco calicheamicina y los conjugados de

fármaco y anticuerpo descritos. En determinadas modalidades, como las que se muestran en la Fórmula II, el componente de calicheamicina de los conjugados de fármaco y anticuerpo descritos comprenderá la N-acetil calicheamicina γ_1^1 (N-Ac calicheamicina).

Las calicheamicinas se dirigen a los ácidos nucleicos y provocan la escisión de la hebra, lo que destruye de esta manera la célula diana. Más específicamente, se ha encontrado que las calicheamicinas se unen al surco menor del ADN, donde luego experimentan una reacción análoga a la ciclización de Bergman para generar una especie dirradical. En este aspecto, la subunidad de aril tetrasacárido sirve para administrar el fármaco a su diana, al unirse estrechamente al surco menor del ADN de doble hélice como se demuestra por Crothers y otros (1999). Cuando un nucleófilo (por ejemplo, el glutatión) ataca el átomo de azufre central del grupo trisulfuro provoca un cambio significativo en la geometría estructural e impone una gran tensión sobre el anillo de enediino de 10 miembros. Esta tensión se alivia completamente cuando el enediino se somete a una reacción de cicloaromatización, lo que genera un dirradical 1,4-benzenoide altamente reactivo y conduce, finalmente, a la escisión del ADN mediante la atracción de los átomos de hidrógeno de la cadena principal de desoxirribosa del ADN, lo que da como resultado la escisión de la cadena. Tenga en cuenta que, en los constructos de análogos de disulfuro de la calicheamicina de la presente invención, el nucleófilo escinde el enlace disulfuro protegido para producir el dirradical deseado.

Más particularmente, se entiende que D comprende explícitamente a cualquier miembro de la clase de calicheamicina como se conoce en la técnica, en donde el resto terminal $-S-S-S-CH_3$ puede sustituirse con $-S-S-$

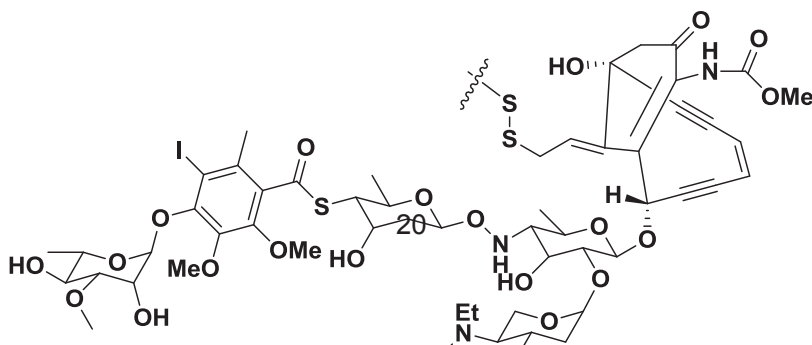


en donde el símbolo



representa el punto de unión a un enlazador.

Por tanto, en determinadas formas de modalidad, D es de la Fórmula V,



en donde R^1 es hidrógeno, halógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, $-CN$, $-C(O)R^{1E}$, $-OR^{1A}$, $-NR^{1B}R^{1C}$, $-C(O)OR^{1A}$, $-C(O)NR^{1B}R^{1C}$, $-SR^{1D}$, $-SO_{n1}R^{1B}$ o $-SO_{v1}NR^{1B}R^{1C}$. En determinadas modalidades seleccionadas, R^1 comprenderá H. En otras modalidades seleccionadas, R^1 comprenderá $-C(O)CH_3$.

R^{1A} , R^{1B} , R^{1C} , R^{1D} y R^{1E} son independientemente hidrógeno, halógeno, $-CF_3$, $-CCl_3$, $-CBr_3$, $-Cl_3$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-N(O)_2$, $-SH$, $-S(O)_3H$, $-S(O)_4H$, $-S(O)_2NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-NHC(O)NHNH_2$, $-NHC(O)NH_2$, $-NHS(O)_2H$, $-NHC(O)H$, $-NHC(O)-OH$, $-NHOH$, $-OCF_3$, $-OCCl_3$, $-OCBr_3$, $-OCl_3$, $-OCHF_2$, $-OCHCl_2$, $-OCHBr_2$, $-OCHI_2$, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

En algunas modalidades, los sustituyentes R^{1B} y R^{1C} unidos al mismo átomo de nitrógeno pueden opcionalmente unirse para formar un heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o un heteroarilo sustituido o no sustituido. El símbolo $n1$ es independientemente un número entero de 0 a 4, el símbolo $v1$ es independientemente 1 o 2 y el símbolo



representa el punto de unión a un enlazador.

Con respecto a la Fórmula V, se apreciará que el compuesto ilustrado comprende un análogo de disulfuro de calicheamicina (por ejemplo, un análogo de N-acetil calicheamicina como se muestra en la Fórmula II) preferentemente unido a un grupo protector de disulfuro (en el punto de unión representado por



que se une covalentemente al resto del enlazador. El grupo protector de disulfuro mejora la estabilidad del enlace disulfuro en el torrente sanguíneo y permite la síntesis eficaz de los constructos de enlazador y calicheamicina descritos. En determinadas modalidades, el grupo disulfuro de la calicheamicina está protegido preferentemente por un grupo arilo o alifático bifuncional sustituido o no sustituido de cadena corta ("grupo protector de disulfuro") que proporciona estabilidad (por ejemplo, estabilidad en el plasma) hasta que el ADC alcanza la célula diana. Más específicamente, la configuración del grupo protector de disulfuro proporciona un grado de impedimento estérico para el enlace disulfuro, lo que reduce de esta manera su susceptibilidad a la escisión mediante reacciones de intercambio de tiol-disulfuro. En esta posición, el grupo protector de disulfuro une covalentemente el grupo disulfuro de la calicheamicina con el resto del enlazador no escindible.

Al alcanzar la diana (por ejemplo, una célula cancerosa), el enlazador preferentemente se cortará o se degradará para liberar la calicheamicina unida a parte del enlazador a través del grupo protector de disulfuro. En determinadas modalidades, una vez que el enlazador se ha escindido inicialmente más allá del grupo protector de disulfuro (es decir, distal de la calicheamicina), el resto del enlazador unido a la calicheamicina se degradará en condiciones fisiológicas hasta el punto en que el enlace disulfuro se corta (preferentemente intracelularmente) seguido del reordenamiento y la formación de la especie de la calicheamicina birradical activa. Esta es la forma de la carga de calicheamicina que se une al surco menor del ADN celular e induce los efectos citotóxicos deseados (véase Walker y otros, *Biochemistry* 89: 4608-4612, 5/92, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad como referencia).

Compuestos enlazadores

Como se indicó anteriormente, las cargas útiles compatibles con la presente invención comprenden una o más cargas y un enlazador no escindible que asocia las cargas con el agente de dirección del anticuerpo. Los enlazadores no escindibles compatibles se unen covalentemente con el residuo reactivo del anticuerpo (preferentemente una cisteína o lisina) y la calicheamicina a través del resto disulfuro.

En modalidades particularmente preferidas, el enlazador comprenderá enlazadores no escindibles seleccionados. En determinadas modalidades, los ADC comprenderán enlazadores no escindibles compatibles que contienen polietilenglicol unido a amida o espaciadores de alquilo que liberan la carga útil de calicheamicina durante la degradación lisosómica del ADC dentro de la célula diana. Un enlazador no escindible particularmente compatible usado en la Fórmula II se muestra inmediatamente a

[illegible]

Conjugación

Antes de la conjugación, los anticuerpos pueden volverse reactivos para la conjugación con los reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como el ditiotreitolo (DTT) o el (*tris*(2-carboxietilo)fosfina (TCEP). En otras modalidades, pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con los reactivos, que incluyen, pero no se limitan a, 2-iminotiolano (reactivo de Traut), SATA, SATP o SAT(PEG)₄, lo que da como resultado la conversión de una amina en un tiol.

Los reactivos de conjugación incluyen comúnmente maleimida, haloacetilo, éster succinimidílico de yodoacetamida, isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriazinilo, éster pentafluorofenílico y fosforamidita, aunque también pueden usarse otros grupos funcionales. En determinadas modalidades, los métodos incluyen, por ejemplo, el uso de maleimidas, yodoacetimididas o haluros de haloacetilo/alquilo, aziridina, derivados de acrililo para reaccionar con el tiol de una cisteína para producir un tioéter que es reactivo con un compuesto. El intercambio de disulfuro de un tiol libre con un piridildisulfuro activado también es útil para producir un conjugado (por ejemplo, el uso de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)). Preferentemente, se usa una maleimida.

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos específicos de sitio o los anticuerpos diseñados permiten preparaciones de conjugado que exhiben una estabilidad mejorada y una homogeneidad sustancial debida, al menos en parte, a la provisión de sitios de cisteínas libres diseñados y/o los nuevos procedimientos de conjugación establecidos en la presente descripción. A diferencia de la metodología de conjugación convencional que reduce total o parcialmente cada uno de los enlaces disulfuro intracatenario o intercatenario del anticuerpo para proporcionar los sitios de conjugación (y es totalmente compatible con la presente invención), la presente invención proporciona además la reducción selectiva de determinados sitios de cisteínas libres preparados y la unión del enlazador del fármaco al mismo.

En este aspecto, se apreciará que la especificidad de la conjugación promovida por los sitios diseñados y la reducción selectiva permite un alto porcentaje de conjugación dirigida al sitio en las posiciones deseadas. De manera significativa, algunos de estos sitios de conjugación, tales como los presentes en la región terminal de la región constante de la cadena ligera, son típicamente difíciles de conjugar de manera efectiva ya que tienden a reaccionar de forma cruzada con otras cisteínas libres. Sin embargo, a través de la ingeniería molecular y la reducción selectiva de las cisteínas libres resultantes, pueden obtenerse tasas de conjugación eficientes que reducen considerablemente los contaminantes con una DAR alta no deseados y toxicidad no específica. De manera más general, los constructos diseñados y los nuevos métodos de conjugación descritos que comprenden la reducción selectiva proporcionan preparaciones de ADC que tienen una farmacocinética y/o farmacodinámica mejoradas y, potencialmente, un índice terapéutico mejorado.

En determinadas modalidades, los constructos específicos de sitio presentan cisteína o cisteínas libres que, cuando se reducen, comprenden grupos tiol que son nucleófilos

y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores tales como los que se describieron anteriormente. Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de la presente invención preferentemente tienen cisteínas intercatenarias no emparejadas reducibles, es decir, cisteínas que proporcionan tales grupos nucleófilos. Por tanto, en determinadas modalidades, la reacción de los grupos sulfhidrilo libres de las cisteínas libres reducidas y los grupos maleimida o haloacetamida terminales de los enlazadores del fármaco compatibles proporcionará la conjugación deseada. En tales casos, las cisteínas libres de los anticuerpos pueden volverse reactivas para la conjugación con los reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el ditioneitol (DTT) o el (*tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Cada cisteína libre presentará así, teóricamente, un nucleófilo tiol reactivo. Si bien tales reactivos son particularmente compatibles con la presente invención, se apreciará que la conjugación de los anticuerpos específicos de sitio puede lograrse mediante el uso de diversas reacciones, condiciones y reactivos generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

Además, se ha descubierto que las cisteínas libres de los anticuerpos diseñados pueden reducirse selectivamente para proporcionar una conjugación dirigida al sitio mejorada y una reducción de contaminantes potencialmente tóxicos no deseados. Más específicamente, se ha encontrado que los “agentes estabilizantes” como la arginina modulan las interacciones intra e intermoleculares en las proteínas y pueden usarse, junto con los agentes reductores seleccionados (preferentemente los relativamente suaves), para reducir selectivamente las cisteínas libres y facilitar la conjugación específica de sitio como se establece en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, los términos “reducción selectiva” o “reducir selectivamente” pueden usarse indistintamente y significarán la reducción de la cisteína o las cisteínas libres sin romper sustancialmente los enlaces disulfuro nativos presentes en el anticuerpo diseñado. En modalidades seleccionadas, esta reducción selectiva puede efectuarse mediante el uso de determinados agentes reductores o determinadas concentraciones de agentes reductores. En otras modalidades, la reducción selectiva de un constructo diseñado comprenderá el uso de agentes estabilizantes en combinación con agentes reductores (incluidos los agentes reductores suaves). Se apreciará que el término “conjugación selectiva” significará la conjugación de un anticuerpo diseñado que se ha reducido selectivamente en presencia de una citotoxina como se describe en la presente descripción. En este sentido, el uso de tales agentes estabilizantes (por ejemplo, la arginina) en combinación con los agentes reductores

seleccionados puede mejorar notablemente la eficacia de la conjugación específica de sitio, determinada por el grado de conjugación en las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos y la distribución de la DAR de la preparación. Los constructos de anticuerpos compatibles y los reactivos y las técnicas de conjugación selectiva se describen ampliamente en el documento núm. WO2015/031698 que se incorpora en la presente descripción específicamente en cuanto a dicha metodología y los constructos.

Sin desear estar sujeto a ninguna teoría en particular, tales agentes estabilizantes pueden actuar para modular el microentorno electrostático y/o modular los cambios conformacionales en el sitio de conjugación deseado, lo que permite de esta manera que los agentes reductores relativamente suaves (que no reducen materialmente los enlaces disulfuro nativos intactos) faciliten la conjugación en el sitio o los sitios de cisteínas libres deseados. Se conoce que tales agentes (por ejemplo, determinados aminoácidos) forman puentes salinos (a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) y pueden modular las interacciones proteína-proteína de tal manera que impartan un efecto estabilizante que puede causar cambios conformacionales favorables y/o reducir las interacciones proteína-proteína desfavorables. Además, tales agentes pueden actuar para inhibir la formación de los enlaces cisteína-cisteína intramoleculares (e intermoleculares) no deseados después de la reducción, lo que facilita de esta manera la reacción de conjugación deseada en donde la cisteína específica de sitio diseñada se une al fármaco (preferentemente mediante un enlazador). Dado que las condiciones de reducción selectiva no proporcionan la reducción significativa de los enlaces disulfuro nativos intactos, la reacción de conjugación posterior se dirige de manera natural a los relativamente pocos tioles reactivos en las cisteínas libres (por ejemplo, preferentemente 2 tioles libres por anticuerpo). Como se mencionó anteriormente, tales técnicas pueden usarse para reducir considerablemente los niveles de conjugación no específica y las correspondientes especies de DAR no deseadas en las preparaciones de conjugado fabricadas de acuerdo con la presente descripción.

En modalidades seleccionadas, los agentes estabilizantes compatibles con la presente invención comprenderán generalmente compuestos con al menos un resto que tiene un pKa básico. En determinadas modalidades, el resto comprenderá una amina primaria mientras que en otras modalidades el resto amina comprenderá una amina secundaria. En otras modalidades más, el resto amina comprenderá una amina terciaria o un grupo guanidinio. En otras modalidades seleccionadas, el resto amina

comprenderá un aminoácido, mientras que en otras modalidades compatibles el resto amina comprenderá una cadena lateral de aminoácidos. En otras modalidades más, el resto amina comprenderá un aminoácido proteinogénico. En otras modalidades más, el resto amina comprende un aminoácido no proteinogénico. En algunas modalidades, los agentes estabilizantes compatibles pueden comprender la arginina, la lisina, la prolina y la cisteína. En determinadas modalidades preferidas, el agente estabilizante comprenderá la arginina. Además, los agentes estabilizantes compatibles pueden incluir la guanidina y los heterociclos que contienen nitrógeno con pKa básico.

En determinadas modalidades, los agentes estabilizantes compatibles comprenden los compuestos con al menos un resto amina que tiene un pKa mayor de aproximadamente 7,5, en otras modalidades el resto amina objeto tendrá un pKa mayor de aproximadamente 8,0, en otras modalidades más el resto amina tendrá un pKa mayor de aproximadamente 8,5 y en otras modalidades más el agente estabilizante comprenderá un resto amina que tiene un pKa mayor de aproximadamente 9,0. Otras modalidades comprenderán agentes estabilizantes en los que el resto amina tendrá un pKa mayor de aproximadamente 9,5, mientras que otras determinadas modalidades comprenderán agentes estabilizantes que presenten al menos un resto amina que tenga un pKa mayor de aproximadamente 10,0. En otras modalidades más, el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene el resto amina con un pKa mayor de aproximadamente 10,5; en otras modalidades, el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene un resto amina con un pKa mayor de aproximadamente 11,0, mientras que en otras modalidades más, el agente estabilizante comprenderá un resto amina con un pKa mayor de aproximadamente 11,5. En otras modalidades más, el agente estabilizante comprenderá un compuesto que tiene un resto amina con un pKa mayor de aproximadamente 12,0, mientras que en otras modalidades más el agente estabilizante comprenderá un resto amina con un pKa mayor de aproximadamente 12,5. Los expertos en la técnica entenderán que los pKa relevantes pueden calcularse o determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas estándar y usarse para determinar la aplicabilidad de usar un compuesto seleccionado como un agente estabilizante.

Se muestra que los agentes estabilizantes descritos son particularmente eficaces para dirigir la conjugación a las cisteínas libres específicas de sitio cuando se combinan con determinados agentes reductores. Para los propósitos de la presente invención, los agentes reductores compatibles pueden incluir cualquier compuesto que produzca una cisteína específica de sitio libre reducida para la conjugación sin interrumpir

significativamente los enlaces disulfuro nativos del anticuerpo diseñado. En tales condiciones, proporcionadas preferentemente por la combinación de los agentes estabilizantes y reductores seleccionados, el enlazador del fármaco activado se limita en gran medida a unirse al sitio o los sitios de cisteínas libres específicos de sitio deseados. Se prefieren particularmente los agentes reductores relativamente suaves o los agentes reductores usados a concentraciones relativamente bajas para proporcionar condiciones suaves. Como se usa en la presente descripción, los términos “agente reductor suave” o “condiciones reductoras suaves” deben entenderse como cualquier agente o estado provocado por un agente reductor (opcionalmente en presencia de agentes estabilizantes) que proporciona tioles en el sitio o los sitios de cisteínas libres sin interrumpir sustancialmente los enlaces disulfuro nativos presentes en el anticuerpo diseñado. Es decir, los agentes o las condiciones reductoras suaves (preferentemente en combinación con un agente estabilizante) pueden reducir eficazmente la cisteína o las cisteínas libres (proporcionar un tiol) sin alterar significativamente los enlaces disulfuro nativos de la proteína. Las condiciones reductoras deseadas pueden proporcionarse por varios compuestos basados en sulfhidrilo que establecen el entorno apropiado para la conjugación selectiva. En modalidades, los agentes reductores suaves pueden comprender compuestos que tienen uno o más tioles libres mientras que en algunas modalidades los agentes reductores suaves comprenderán compuestos que tienen un solo tiol libre. Los ejemplos no limitantes de los agentes reductores compatibles con las técnicas de reducción selectiva de la presente invención comprenden el glutatión, la n-acetil cisteína, la cisteína, el 2-aminoetano-1-tiol y el 2-hidroxietano-1-tiol.

Se apreciará además que los anticuerpos diseñados capaces de conjugarse pueden contener residuos de cisteína libres que comprenden grupos sulfhidrilo que se bloquean o se protegen a medida que el anticuerpo se produce o se almacena. Dichas protecciones incluyen moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, iones y otros materiales que interactúan con el grupo sulfhidrilo y previenen o inhiben la formación de conjugados. En algunos casos, el anticuerpo diseñado no conjugado puede comprender cisteínas libres que se unen a otras cisteínas libres en los mismos anticuerpos o en diferentes anticuerpos. Como se analiza en la presente descripción, dicha reactividad cruzada puede conducir a diversos contaminantes durante el procedimiento de fabricación. En algunas modalidades, los anticuerpos diseñados pueden requerir la desprotección antes de una reacción de conjugación. En modalidades específicas, los anticuerpos en la presente descripción no están

protegidos y presentan un grupo sulfhidrilo libre capaz de conjugarse. En modalidades específicas, los anticuerpos en la presente descripción se someten a una reacción de desprotección que no altera ni reordena los enlaces disulfuro de origen natural. Se apreciará que en la mayoría de los casos las reacciones de desprotección se producirán durante las reacciones de reducción normales (reducción o reducción selectiva).

Purificación y distribución de la DAR

En modalidades seleccionadas, la metodología de conjugación y purificación compatible con la presente invención proporciona ventajosamente la capacidad de generar preparaciones de ADC relativamente homogéneas que comprenden una distribución de la DAR estrecha. En este aspecto, los constructos que se describen (por ejemplo, los constructos específicos de sitio) y/o la conjugación selectiva proporcionan homogeneidad de las especies de ADC dentro de una muestra en términos de la relación estequiométrica entre el fármaco y el anticuerpo diseñado y con respecto a la ubicación de la toxina. Como se discutió de manera breve anteriormente, el término “relación de fármaco a anticuerpo” o “DAR” se refiere a la relación molar de fármaco a anticuerpo en una preparación de ADC. En determinadas modalidades, una preparación de conjugado puede ser sustancialmente homogénea con respecto a su distribución de la DAR, lo que significa que dentro de la preparación de ADC hay una especie predominante de ADC específico de sitio con una carga de fármaco particular (por ejemplo, una carga de fármaco de 2) que también es uniforme con respecto al sitio de carga (es decir, en las cisteínas libres). En otras determinadas modalidades de la invención, es posible lograr la homogeneidad deseada mediante el uso de los anticuerpos específicos de sitio y/o la reducción selectiva y la conjugación. En otras modalidades, la homogeneidad deseada puede lograrse mediante el uso de los constructos específicos de sitio en combinación con la reducción selectiva. En otras modalidades más, las preparaciones compatibles pueden purificarse mediante el uso de las técnicas de cromatografía analítica o preparativa para proporcionar la homogeneidad deseada. En cada una de estas modalidades, la homogeneidad de la muestra de ADC puede analizarse mediante el uso de las diversas técnicas conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, la espectrometría de masas, la HPLC (por ejemplo, la HPLC de exclusión molecular, la RP-HPLC, la HIC-HPLC, etc.) o la electroforesis capilar.

Con respecto a la purificación de las preparaciones de ADC, se apreciará que pueden emplearse los métodos de preparación farmacéutica estándar para obtener la pureza

deseada. Como se analiza en la presente descripción, los métodos de cromatografía líquida, tales como la cromatografía de fase inversa (RP) y la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), pueden separar los compuestos en la mezcla por el valor de la carga de fármaco. En algunos casos, también pueden usarse la cromatografía de intercambio iónico (IEC) o de modo mixto (MMC) para aislar las especies con una carga de fármaco específica.

En cualquier caso, los ADC descritos y las preparaciones de estos pueden comprender los restos del fármaco y el anticuerpo en diversas relaciones molares estequiométricas que dependen de la configuración del anticuerpo y, al menos en parte, del método usado para efectuar la conjugación. En determinadas modalidades preferidas, la carga de fármaco por ADC puede comprender 2 cargas de calicheamicina.

A pesar del nivel relativamente alto de homogeneidad proporcionado por la presente invención, las composiciones descritas comprenden realmente una mezcla de conjugados con una variedad de compuestos farmacológicos. Como tales, las composiciones de ADC descritas incluyen las mezclas de conjugados donde la mayoría de los anticuerpos constituyentes se unen covalentemente a uno o más restos de fármaco y (a pesar de la relativa especificidad del conjugado proporcionada por los constructos diseñados y la reducción selectiva) donde los restos de fármaco pueden unirse al anticuerpo por varios grupos tiol. Es decir, después de la conjugación, las composiciones de la invención comprenderán una mezcla de ADC con diferentes cargas de fármaco a diversas concentraciones (junto con determinados contaminantes de la reacción provocados principalmente por la reactividad cruzada de la cisteína libre). Sin embargo, mediante el uso de la reducción selectiva y la purificación posterior a la fabricación, las composiciones de conjugado pueden llevarse al punto en el que contienen en gran medida una única especie predominante deseada de ADC (por ejemplo, con una carga de fármaco de 2) con niveles relativamente bajos de otras especies de ADC (por ejemplo, con una carga de fármaco de 1, 4, 6, etc.). El valor de DAR promedio representa el promedio ponderado de la carga de fármaco para la composición en su conjunto (es decir, todas las especies de ADC tomadas juntas). Los expertos en la técnica apreciarán que las especificaciones o los valores de DAR aceptables se presentan a menudo como un promedio, un intervalo o distribución (es decir, una DAR promedio de 2 +/- 0,5). Preferentemente, las composiciones que comprenden una DAR promedio medida dentro del intervalo (es decir, de 1,5 a 2,5) se usarían en un entorno farmacéutico.

Por tanto, en algunas modalidades, la presente invención comprenderá las composiciones que tengan una DAR promedio de $2 \pm 0,5$. En otras modalidades, la presente invención comprenderá una DAR promedio de $2 \pm 0,4$ o una DAR de $2 \pm 0,3$ o una DAR de $2 \pm 0,2$. En otras modalidades, las composiciones de conjugado de IgG1 comprenderán preferentemente una composición con niveles relativamente bajos (es decir, menos del 30 %) de especies de ADC no predominantes (por ejemplo, los ADC con una carga de fármaco de 0, 1, 3, 4, 5, etc.). En algunas modalidades, la composición de ADC comprenderá una DAR promedio de $2 \pm 0,4$ con niveles relativamente bajos ($< 30 \%$) de especies de ADC no predominantes. En algunas modalidades, la composición de ADC comprenderá una DAR promedio de $2 \pm 0,3$ con niveles relativamente bajos ($< 30 \%$) de especies de ADC no predominantes. En otras modalidades más, las especies de ADC predominantes (por ejemplo, con una carga de fármaco de 2) estarán presentes a una concentración mayor que el 50 %, a una concentración mayor que el 55 %, a una concentración mayor que el 60 %, a una concentración mayor que el 65 %, a una concentración mayor que el 70 %, a una concentración mayor que el 75 %, a una concentración mayor que el 80 %, a una concentración mayor que el 85 %, a una concentración mayor que el 90 %, a una concentración mayor que el 93 %, a una concentración mayor que el 95 % o incluso a una concentración mayor que el 97 % cuando se mide frente a todas las demás especies de DAR presentes en la composición.

Como se detalla en los ejemplos siguientes, la distribución de los fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC a partir de las reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales, tales como la espectrofotometría UV-Vis, la HPLC de fase inversa, la HIC, la espectroscopía de masas, el ELISA y la electroforesis. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de fármacos por anticuerpo.

Preparaciones farmacéuticas y usos terapéuticos

Los anticuerpos o los ADC de la invención pueden formularse de diversas formas mediante el uso de las técnicas reconocidas en la técnica. En algunas modalidades, las composiciones terapéuticas de la invención pueden administrarse puras o con un mínimo de componentes adicionales, mientras que otras pueden formularse opcionalmente para contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados. Como se usa en la presente descripción, los “portadores farmacéuticamente aceptables” comprenden los excipientes, los vehículos, los adyuvantes y los diluyentes que se conocen bien en la técnica.

Dosis y regímenes de dosificación

El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el momento y la repetición, dependerán del individuo en particular, así como también de las consideraciones empíricas tales como la farmacocinética (por ejemplo, la vida media, la tasa de depuración, etc.). La determinación de la frecuencia de administración puede realizarse por expertos en la técnica, tales como un médico tratante, sobre la base de las consideraciones de la afección y la gravedad de la afección que se está tratando, la edad y el estado general de salud del sujeto que se está tratando y similares. La frecuencia de administración puede ajustarse durante el curso de la terapia sobre la base de la evaluación de la eficacia de la composición seleccionada y el régimen de dosificación. Tal evaluación puede realizarse sobre la base de los marcadores de la enfermedad, el trastorno o la afección específicos. En las modalidades en las que el individuo tiene cáncer, estas incluyen las mediciones directas del tamaño del tumor mediante palpación u observación visual; la medición indirecta del tamaño del tumor mediante rayos X u otras técnicas de imagen; una mejoría evaluada mediante la biopsia directa del tumor y el examen al microscópico de una muestra del tumor; la medición de un marcador tumoral indirecto o un antígeno identificado de acuerdo con las técnicas reconocidas en la técnica; la reducción del número de células proliferativas o tumorigénicas, el mantenimiento de la reducción de tales células neoplásicas; la reducción de la proliferación de las células neoplásicas; o el retraso en el desarrollo de metástasis.

Indicaciones

La invención proporciona el uso de un ADC de la invención para el tratamiento de diversos trastornos neoplásicos. En determinadas modalidades, las enfermedades a tratar son afecciones neoplásicas que comprenden tumores sólidos. En modalidades seleccionadas, el ADC de la invención se usará para tratar tumores o células tumorigénicas que expresan un determinante de SEZ6. En otras determinadas modalidades, el ADC descrito se usará para tratar a un sujeto que padece el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). Preferentemente, el “sujeto” o “paciente” a tratar será un ser humano aunque, como se usa en la presente descripción, se considera que los términos comprenden explícitamente cualquier especie de mamífero.

En modalidades seleccionadas, el ADC puede administrarse a pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas que presentan la enfermedad en estadio limitado o la enfermedad en estadio extenso. En otras modalidades, el ADC descrito se administrará a los pacientes resistentes (es decir, aquellos cuya enfermedad

reaparece durante o poco después de completar un ciclo de terapia inicial); los pacientes sensibles (es decir, aquellos cuya recaída dura más de 2-3 meses después de la terapia primaria); o los pacientes que presentan resistencia a un agente basado en platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino) y/o un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel o cabazitaxel). En determinadas modalidades preferidas, el ADC contra SEZ6 de la presente invención puede administrarse a pacientes de primera línea. En otras modalidades, el ADC contra SEZ6 de la presente invención puede administrarse a pacientes de segunda línea. En otras modalidades más, el ADC contra SEZ6 de la presente invención puede administrarse a pacientes de tercera línea o de cuarta línea.

Artículos de fabricación

La invención incluye los paquetes y los kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes o receptáculos, en donde un recipiente puede comprender una o más dosis del ADC de la invención. En determinadas modalidades, el paquete o el kit contienen una dosis unitaria, es decir, una cantidad predeterminada de una composición que comprende, por ejemplo, el ADC de la invención, con o sin uno o más agentes adicionales y opcionalmente, uno o más agentes anticancerígenos.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o más soluciones líquidas, se prefiere una solución acuosa o no acuosa, aunque típicamente se prefiere una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa estéril. La formulación en el kit también puede proporcionarse como polvo o polvos secos o en forma liofilizada que puede reconstituirse tras la adición de un líquido apropiado. El líquido usado para la reconstitución puede contenerse en un recipiente aparte. Dichos líquidos pueden comprender amortiguadores estériles, farmacéuticamente aceptables u otro diluyente o diluyentes tales como el agua bacteriostática para inyección. Cuando el kit comprende el ADC de la invención en combinación con agentes terapéuticos o agentes adicionales, la solución puede mezclarse previamente, ya sea en una combinación equivalente molar o con un componente en exceso del otro. Alternativamente, el ADC de la invención y cualquier agente anticancerígeno opcional u otro agente pueden mantenerse por separado dentro de distintos recipientes antes de la administración a un paciente.

En determinadas modalidades preferidas, los kits mencionados anteriormente, que incorporan las composiciones de la invención, comprenderán una etiqueta, un marcador, un prospecto, un código de barras y/o un texto que indique que el contenido del kit puede usarse para el tratamiento del cáncer. En otras modalidades preferidas,

el kit puede comprender una etiqueta, un marcador, un prospecto, un código de barras y/o un texto que indique que el contenido del kit puede administrarse de acuerdo con una determinada dosis o régimen de dosificación para tratar a un sujeto que padece cáncer. En otros aspectos particularmente preferidos, la etiqueta, el marcador, el prospecto, el código de barras y/o el texto indican que el contenido del kit puede usarse para el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas o un régimen de dosificación para el tratamiento del mismo.

Los recipientes o los receptáculos adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de infusión (bolsas intravenosas), etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como el vidrio o los plásticos farmacéuticamente compatibles. En determinadas modalidades, el receptáculo o los receptáculos pueden comprender 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.

En algunas modalidades, el kit puede contener un medio por el cual administrar el ADC y cualquier componente opcional a un paciente, por ejemplo, una o más agujas o jeringas (precargadas o vacías), u otro aparato similar, a partir del cual la formulación puede inyectarse o introducirse en el sujeto o aplicarse en un área enferma del cuerpo. Los kits de la invención también incluirán típicamente un medio para contener los viales, o similares, y otros componentes en confinamiento estrecho para la venta comercial, como, por ejemplo, los recipientes de plástico moldeados por soplado en los que se colocan y se mantienen los viales deseados y otros aparatos.

Observaciones

A menos que se defina de cualquier otra manera en la presente descripción, los términos científicos y técnicos usados en relación con la invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Además, los intervalos proporcionados en la especificación y las reivindicaciones adjuntas incluyen ambos puntos finales y todos los puntos entre los puntos finales. Por lo tanto, un intervalo de 2,0 a 3,0 incluye 2,0, 3,0 y todos los puntos entre 2,0 y 3,0.

Generalmente, las técnicas de cultivo celular y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química que se describen en la presente descripción son las que se conocen y comúnmente se usan en la técnica. La nomenclatura usada en la presente descripción, en asociación con tales técnicas,

también se usa comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la invención se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales que se conocen bien en la técnica y como se describen en varias referencias que se citan a lo largo de la presente especificación a menos que se indique de cualquier otra manera.

Referencias

La descripción completa de todas las patentes, las solicitudes de patente y las publicaciones, y el material disponible electrónicamente (que incluye, por ejemplo, las presentaciones de las secuencias de nucleótidos en, por ejemplo, GenBank y RefSeq, y las presentaciones de las secuencias de aminoácidos en, por ejemplo, SwissProt, PIR, PRF, PDB, y las traducciones de las regiones de codificación anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en la presente descripción se incorporan como referencia, independientemente de si la frase “incorporada por referencia” se usa o no en relación con la referencia en particular. La descripción detallada anterior y los ejemplos que siguen se han proporcionado solo para la claridad de la comprensión. No deben entenderse limitaciones innecesarias a partir de los mismos. La invención no se limita a los detalles exactos que se muestran y se describen. Las variaciones obvias para un experto en la técnica se incluyen en la invención definida por las reivindicaciones. Los títulos de las secciones usados en la presente descripción son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación del tema que se describe.

8 EJEMPLOS

La invención, que se describe en general anteriormente, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos siguientes son todos o los únicos experimentos realizados. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio ponderado, la temperatura está en grados centígrados y la presión es, o está cerca de, la atmosférica.

Resumen del listado de secuencias

La Tabla 2 proporciona un resumen de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos incluidas en la presente descripción.

Tabla 2

SEQ ID NO	Descripción
1	Precursor de la isoforma 1 del homólogo de la proteína de la convulsión 6 (NP_849191)
2	Precursor de la isoforma 2 del homólogo de la proteína de la convulsión 6 (NP_001092105)
3	Secuencia proteica de la cadena pesada de hSEZ6-1.ss1
4	Secuencia proteica de la cadena ligera de hSEZ6-1.ss1
5	Secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia proteica de la cadena

Ejemplo 1: Generación de un anticuerpo de SEZ6

Los anticuerpos murinos de SEZ6 se produjeron de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción mediante la inoculación con SEZ6-Fc humano. En este aspecto, se usaron tres cepas de ratones para generar moduladores de anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad que pueden usarse para asociarse con y/o inhibir la acción de SEZ6 humana (por ejemplo, NP_849191: Precursor de la isoforma 1 del homólogo de la proteína de la convulsión 6; NP_001092105: Precursor de la isoforma 2 del homólogo de la proteína de convulsión 6) para la prevención y/o el tratamiento de diversos trastornos proliferativos. Específicamente, se inmunizaron cepas de ratón Balb/c, CD-1 y FVB con SEZ6-Fc recombinante humano y se usaron para producir los hibridomas.

El antígeno SEZ6-Fc se purificó a partir del sobrenadante de las células CHO-S que sobreexpresan un constructo de SEZ6-Fc. Se usaron 10 µg de inmunógeno SEZ6-Fc para la primera inmunización, seguidos de 5 µg y 2,5 µg de inmunógeno SEZ6-Fc para las tres inmunizaciones y cinco inmunizaciones posteriores, respectivamente. Todas las inmunizaciones se realizaron con el inmunógeno emulsionado con un volumen igual de TITERMAX[®] Gold (CytRx Corporation) o adyuvante de alumbre. Los anticuerpos murinos se generaron mediante la inmunización de seis ratones hembra (dos de cada uno de: Balb/c, CD-1, FVB) a través de la ruta de la almohadilla plantar para todas las inyecciones.

Se usaron los ensayos ELISA en fase sólida para seleccionar los sueros de ratón en busca de anticuerpos IgG de ratón específicos para SEZ6 humana. Una señal positiva por encima del fondo fue indicativa de los anticuerpos específicos para SEZ6. Brevemente, las placas de 96 pocillos (VWR International, Cat. #610744) se recubrieron con SEZ6-His recombinante a 0,5 µg/ml en amortiguador de recubrimiento para ELISA durante la noche. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,02 % (v/v), los pocillos se bloquearon con BSA al 3 % (p/v) en PBS, 200 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). El suero de ratón se tituló (1:100, 1:200,

1:400 y 1:800) y se añadió a las placas recubiertas con SEZ6 a 50 µl/pocillo y se incubó a TA durante 1 hora. Las placas se lavan y luego se incuban con 50 µl/pocillo de anti-IgG de ratón obtenido en cabra marcado con HRP diluido 1:10,000 en BSA-PBS al 3 % o FCS al 2 % en PBS durante 1 hora a TA. Se lavaron las placas nuevamente y se añadieron 40 µl/pocillo de una solución de sustrato TMB (Thermo Scientific 34028) durante 15 minutos a TA. Después del revelado, se añadió un volumen igual de H₂SO₄ 2N para detener el desarrollo del sustrato y las placas se analizaron mediante espectrofotómetro a DO 450.

Los ratones inmunizados con suero positivo se sacrificaron y se disecaron los ganglios linfáticos de drenaje (poplíteo e inguinal e ilíaco medial si estaban agrandados) y se usaron como fuente de células productoras de anticuerpos. Una suspensión de células individuales de células B (228,9x10⁶ células) se fusionó con células de mieloma no secretoras P3X63Ag8.653 (ATCC #CRL-1580) en una relación de 1:1 por electrofusión. La electrofusión se realizó mediante el uso del sistema BTX Hybrimmune™, (BTX Harvard Apparatus) según las instrucciones del fabricante. Después del procedimiento de fusión, las células se resuspendieron en medio de selección de hibridoma suplementado con azaserina (Sigma #A9666), medio DMEM con alto contenido de glucosa con piruvato de sodio (Cellgro cat#15-017-CM) que contenía suero fetal Clone I al 15 % (Hyclone), BM Condimed al 10 % (Roche Applied Sciences), L-glutamina 4 mM, 100 UI de penicilina-estreptomicina y 2-mercaptoetanol 50 µM y luego se sembraron en tres matraces T225 en 90 ml de medio de selección por matraz. Los matraces se colocaron a continuación en una incubadora humidificada con 37 °C que contiene 5 % de CO₂ y 95 % de aire durante 6-7 días.

Después de seis a siete días de crecimiento, la biblioteca que constaba con las células cultivadas en masa en los T225 se sembró en placas de 1 célula por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos Falcon mediante el uso del clasificador de células Aria I. Los hibridomas seleccionados se cultivaron luego en 200 µl de medio de cultivo que contenía suero fetal Clone I al 15 % (Hyclone), BM-Condimed al 10 % (Roche Applied Sciences), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 4 mM, 100 UI de penicilina-estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50 µM e hipoxantina 100 µM. Las células de la biblioteca de hibridomas restantes no usadas se congelaron para futuras pruebas de biblioteca. Después de diez a once días de crecimiento, se analizaron los sobrenadantes de cada pocillo de las células en la placa para detectar los anticuerpos reactivos para SEZ6 mediante ensayos ELISA y FACS.

Para la selección mediante ELISA, se recubrieron las placas de 96 pocillos con SEZ6-Fc a 0,3 µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS/Tween durante una hora a 37 °C y se usaron inmediatamente o se mantuvieron a 4 °C. Los sobrenadantes de los hibridomas no diluidos se incubaron en las placas durante una hora a TA. Las placas se lavaron y se evaluaron con anti-IgG de ratón obtenido en cabra marcado con HRP diluido 1:10,000 en BSA-PBS al 3 % durante una hora a TA. A continuación, las placas se incubaron con solución de sustrato como se describe anteriormente y se leyeron a DO 450. Los pocillos que contenían la inmunoglobulina que se unía preferentemente a SEZ6 humana se transfirieron y se expandieron según se determinó por una señal por encima del fondo.

Los pocillos de los hibridomas de crecimiento positivo seleccionados que secretan la inmunoglobulina murina también se seleccionaron para determinar la especificidad a SEZ6 humana y la reactividad cruzada a SEZ6 de cynomolgus, de rata y murina mediante el uso de un ensayo basado en la citometría de flujo con células 293 diseñadas para sobreexpresar el antígeno específico de la especie seleccionada.

Para los ensayos de citometría de flujo, se incubaron 50×10^4 células h293 transducidas respectivamente con SEZ6 humana, de cynomolgus, de rata o murina durante 30 minutos con 25-100 µl de sobrenadante de hibridoma. Las células se lavaron con PBS, FCS al 2 %, dos veces y luego se incubaron con 50 µl de un anti-fragmento Fc de IgG de ratón obtenido en cabra secundario específico conjugado con DyLight 649 diluido 1:200 en PBS/FCS al 2 %. Después de 15 minutos de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS, FCS al 2 % y se resuspendieron en el mismo amortiguador con DAPI y se analizaron por citometría de flujo mediante el uso de un FACSCanto II según las instrucciones del fabricante. Los pocillos que contenían la inmunoglobulina que se unían preferentemente a las células GFP⁺ SEZ6⁺ se transfirieron y se expandieron. Los hibridomas clonales específicos a hSEZ6 resultantes se criopreservaron en medio de congelación CS-10 (Biolife Solutions) y se almacenaron en nitrógeno líquido. Los anticuerpos que se unían a las células SEZ6 humanas, de cynomolgus, de rata o murinas se anotaron como reactivos cruzados.

El análisis por ELISA y citometría de flujo confirmó que el anticuerpo purificado de la mayoría o de todos estos hibridomas se unía a SEZ6 de una manera dependiente de la concentración. Los pocillos que contenían la inmunoglobulina que se unían a las células GFP SEZ6 se transfirieron y se expandieron. Los hibridomas clonales

resultantes se criopreservaron en medio de congelación CS-10 (Biolife Solutions) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Se realizó una fusión y se sembró en 48 placas (4608 pocillos con una eficacia de clonación de aproximadamente el 40 %). La selección inicial produjo sesenta y tres anticuerpos murinos que se asociaron con SEZ6 humana. Posteriormente se realizó una segunda selección y se obtuvieron 134 anticuerpos que se asociaron con SEZ6 humana.

Ejemplo 2: Fabricación de un anticuerpo de SEZ6 específico de sitio humanizado

Se eligió un anticuerpo del Ejemplo 1 para su posterior procesamiento y humanización. El ARN del hibridoma que expresa el anticuerpo seleccionado se aisló, se amplificó y se secuenció mediante el uso de técnicas estándar reconocidas en la técnica. A partir de la información de la secuencia de nucleótidos, se obtuvieron los datos con respecto a los segmentos de los genes V, D y J de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos objeto. Las secuencias V-(D)-J se alinearon con las secuencias de la línea germinal de Ig de ratón y se seleccionaron las regiones marco variables humanas aceptoras sobre la base de su homología de secuencia más alta con la secuencia marco del ratón objeto y su estructura canónica para el injerto de CDR. La disposición genética resultante para las regiones variables humanizadas del anticuerpo se muestra en la Tabla 3A inmediatamente a continuación.

Tabla 3A

AcM	VH humana	JH humana	Cambios en el marco	VK humana	JK humana	Cambios en el marco
SEZ6-1	IGHV5-51	JH4	ninguna	IGKV-L6	JK4	ninguna

Las regiones variables diseñadas se usaron luego para generar un anticuerpo específico de sitio anti-SEZ6 IgG1/kappa humano que comprende una región constante de la cadena ligera (LC) kappa nativa y una región constante de la cadena pesada (HC) mutada para proporcionar una cisteína no emparejada. En este aspecto, la cisteína 220 (C220) de la región de la bisagra superior de la HC se sustituyó por serina (C220S) para proporcionar el anticuerpo hSEZ6-1.ss1. Cuando se ensamblan, la HC y la LC forman un anticuerpo que comprende dos cisteínas libres en los extremos C-terminales de las regiones constantes de la cadena ligera (por ejemplo,

C214) que son adecuadas para la conjugación con un agente terapéutico. A menos que se indique de cualquier otra manera, toda la numeración de los residuos de la región constante está de acuerdo con el esquema de numeración de EU como se establece en Kabat y otros.

Para generar los constructos específicos de sitio, se clonó un ácido nucleico de VH en un vector de expresión que contenía una región constante de la HC mutada en C220S. Los vectores resultantes que codifican la HC C220S mutante se cotransfectaron en las células CHO-S con un vector que codifica la región variable de la cadena ligera seleccionada asociada operativamente con una LC kappa de IgG1 de tipo salvaje y se expresaron mediante el uso de un sistema de expresión transitoria de mamífero.

Además de la mutación C220S para proporcionar las cisteínas libres en la región constante, se realizaron dos modificaciones adicionales en la cadena pesada. Primero, se eliminó la lisina C-terminal para reducir la heterogeneidad en la expresión. En segundo lugar, se realizó una mutación conservadora en la región variable de la cadena pesada para mejorar la estabilidad molecular y facilitar la producción del anticuerpo. Más específicamente, se incorporó una mutación conservadora en la CDR2 de la cadena pesada (como la define Kabat) para eliminar un sitio de glicosilación canónico. La glicosilación en este sitio podría potencialmente impartir heterogeneidad en la proteína expresada que puede resultar en una reducción en la afinidad de unión. Por consiguiente, se incorporó una sustitución de serina por asparagina en la posición 60 de Kabat (S60N) en la cadena pesada para eliminar el sitio de glicosilación. El anticuerpo humanizado resultante con estas mutaciones se denominó hSEZ6-1.ss1. Como se comenta con más detalle a continuación, se confirmó la afinidad de la equivalencia sustancial de hSEZ6-1.ss1 con el anticuerpo humanizado original y el anticuerpo de origen murino.

La disposición genética resultante para las regiones variables humanizadas del anticuerpo mutado se muestra en la Tabla 3B inmediatamente a continuación.

Tabla 3B

AcM	VH human a	JH human a	Cambios en el marco	Cambios en CDR (VH)	VK humana	JK human a	Cambios en el marco	Cambios en CDR (VK)
SEZ6- 1.ss1	IGHV5- 51	JH4	ninguna	S60N	IGKV-L6	JK4	ninguna	ninguna

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo específico de sitio hSEZ6-1.ss1 de longitud completa es la SEQ ID NO: 3, que tiene el sitio de mutación de la región variable S60N y el sitio de mutación de la región constante C220S. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se muestra a continuación como la SEQ ID NO: 7, que tiene la mutación S60N subrayada.

**EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSSWINWVRQMPGKGLEWMGRIYPGE
GDTNYNGNFEGQVTISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCTRGLVMDYWGGTL
VTVSS**

(SEQ ID NO: 7)

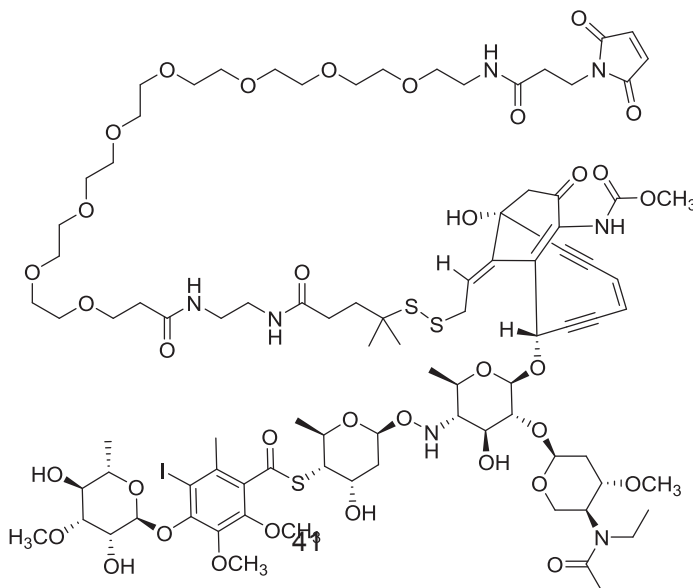
La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo específico de sitio hSEZ6-1.ss1 de longitud completa es la SEQ ID NO: 4, que tiene el residuo de conjugación a la toxina en C214. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera se muestra a continuación como la SEQ ID NO: 8

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV D Y N G I S Y M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y A A S N
VQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSIEDPPTFGGGTKVEIK**

(SEQ ID NO: 8)

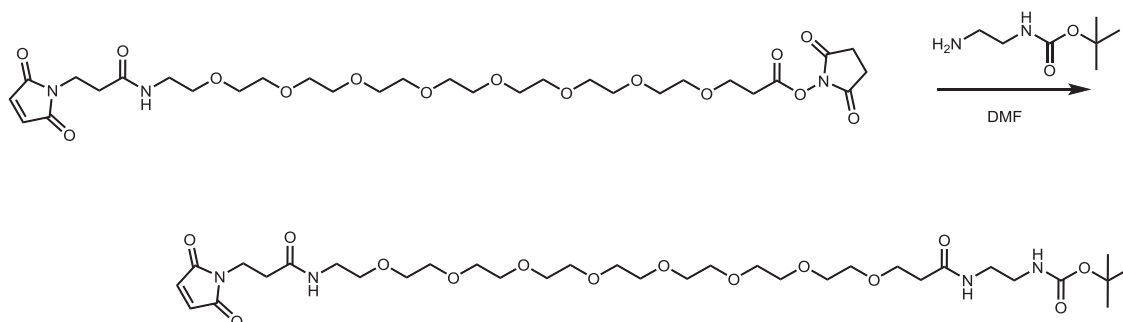
Ejemplo 2: Preparación de hSEZ6-1.ss1 Enlazador del fármaco

Un compuesto enlazador del fármaco de acuerdo con la Fórmula II



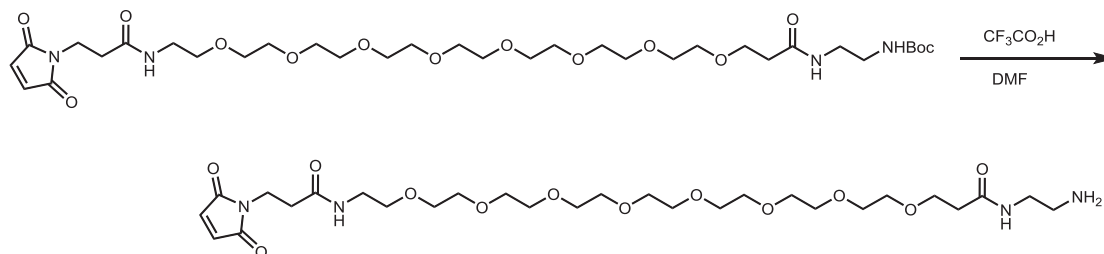
Fórmula II

se sintetizó como se expone inmediatamente a continuación.



Etapas 1. [34-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,32-dioxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaoxa-3,31-diazatetratriacontan-1-il]carbamato de *tert*-butilo

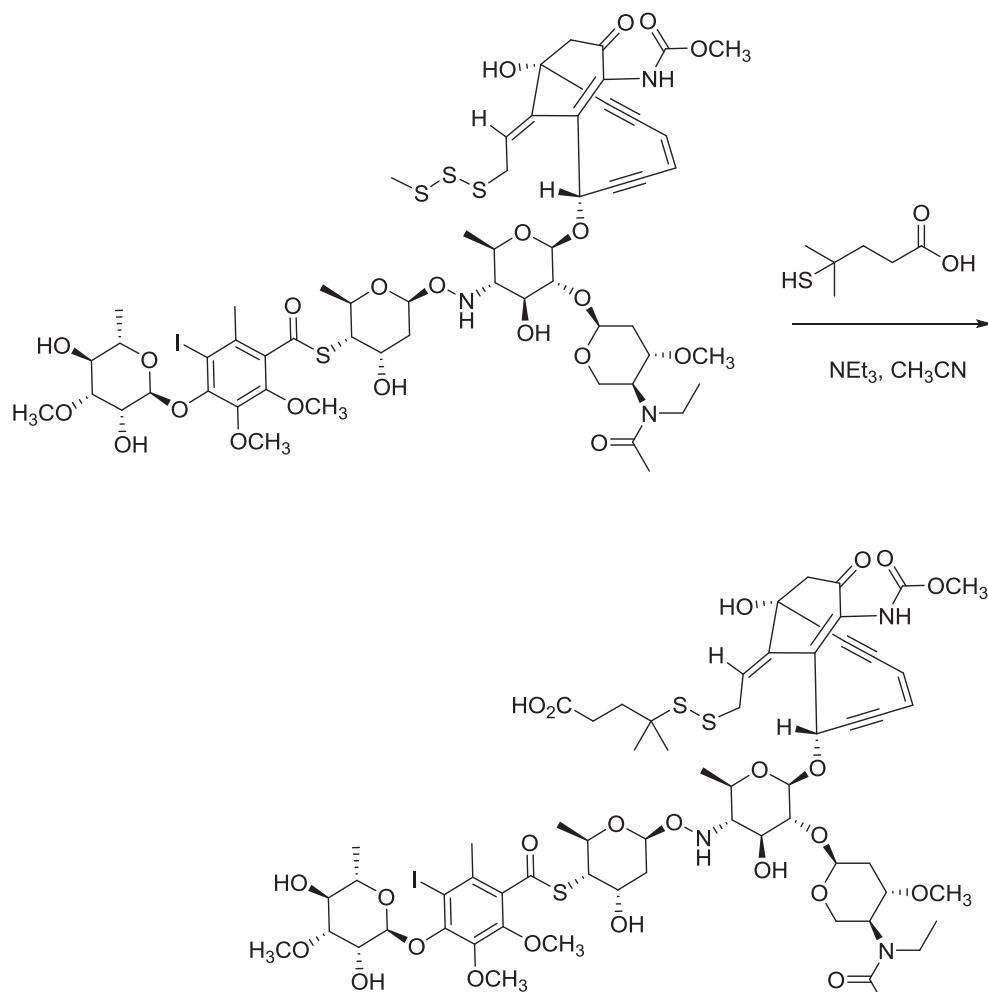
La 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-{27-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-1-il}propanamida (434 mg) se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (5 ml) y se trató con (2-aminoetil)carbamato de *tert*-butilo (108,1 mg). Después de 6 horas, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice y se eluyó con 0 % de CH₃OH/CH₂Cl₂ a 10 % de CH₃OH/CH₂Cl₂ para dar el compuesto del título (154,2 mg). LC/MS (Método analítico A): Rt = 1,65 min, *m/z* 735,46 [M+H]⁺.



Etapas 2. N-(2-aminoetil)-31-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-amida

La amina protegida con *tert*-butoxicarbonilo (Etapas 1, 154,2 mg) se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (5 ml), se añadió ácido trifluoroacético (500 µl) durante 30 segundos

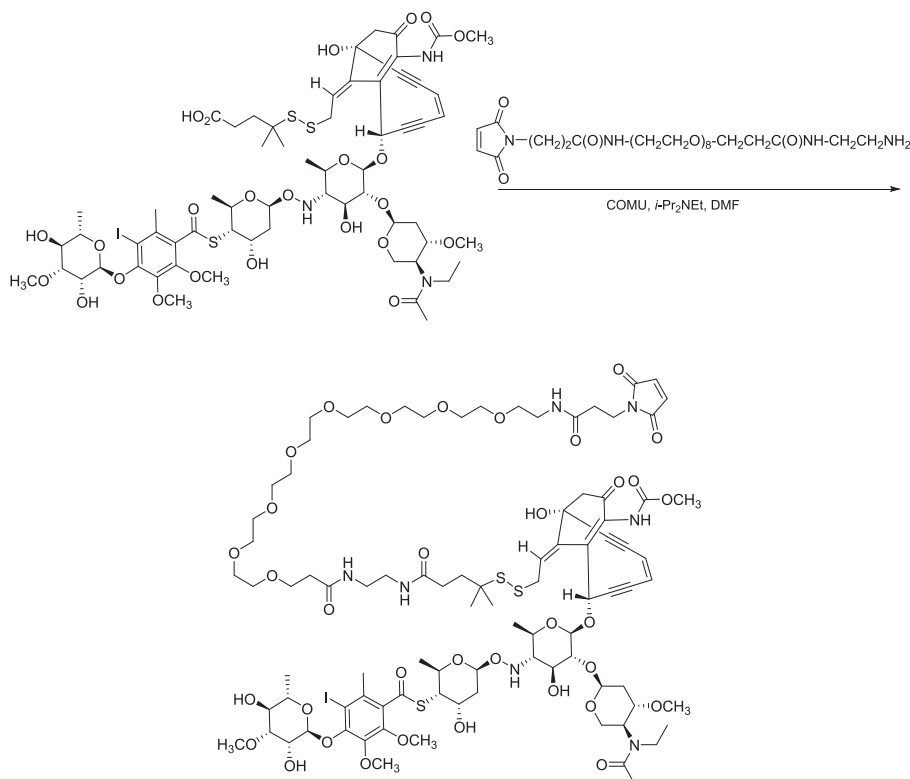
y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró y se usó sin purificación adicional. LC/MS (Método analítico A): $R_t = 1,29$ min, m/z 635,39 $[M+H]^+$.



Etapas 3. ácido 4-[[[(2E)-2-[(1R,4Z,8S)-8-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,4S,5S)-5-[acetil(etil)amino]-4-metoxioxan-2-il]oxi)-5-[[[(2S,4S,5S,6R)-5-[(4-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,5-dihidroxi-4-metoxi-6-metiloxan-2-il]oxi)-3-iodo-5,6-dimetoxi-2-metilbenzoil)sulfanil]-4-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi)amino]-4-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi)-1-hidroxi-10-[(metoxicarbonil)amino]-11-oxobiciclo[7.3.1]trideca-4,9-dieno-2,6-diin-13-ilideno}etil]disulfanil]-4-metilpentanoico

Se disolvió *N*-acetil calicheamicina y 1 (0,2 g, 0,142 mmol, 1 eq) en acetonitrilo (30 ml) y la solución resultante se enfrió hasta -15 °C. Se disolvió ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (0,420 ml, 2,837 mmol, 20 eq) en acetonitrilo (10 ml) y se añadió lentamente a la solución enfriada de *N*-acetil calicheamicina y 1. Se añadió trietilamina

(0,377 ml, 2,837 mmol, 20 eq) a la mezcla de reacción y luego la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 3-18 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla se concentró y el residuo se cargó en seco sobre gel de sílice para la purificación por cromatografía ultrarrápida y se eluyó con 2-20 % de metanol/diclorometano para dar el compuesto del título. El compuesto del título se precipitó en éter dietílico frío. LC/MS (método analítico A): Rt = 1,92 min, m/z 1478,64 $[M+H]^+$.



Etapas 3 y 4. **S-[(2*R*,3*S*,4*S*,6*S*)-6-({[(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-({(2*S*,4*S*,5*S*)-5-[acetil(etil)amino]-4-metoxioxan-2-il}oxi)-6-{{(2*S*,5*Z*,9*R*,13*E*)-13-[43-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,5-dimetil-8,13,41-trioxo-16,19,22,25,28,31,34,37-octaoxa-3,4-ditia-9,12,40-triazatritetracontan-1-ilideno]-9-hidroxi-12-[(metoxycarbonil)amino]-11-oxobiciclo[7.3.1]trideca-1(12),5-dieno-3,7-diin-2-il]oxi}-4-hidroxi-2-metiloxan-3-il]amino}oxi)-4-hidroxi-2-metiloxan-3-il] 4-{{(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,5-dihidroxi-4-metoxi-6-metiloxan-2-il]oxi}-3-iodo-5,6-dimetoxi-2-metilbenceno-1-carbotioato**

Se disolvió ácido *N*-acetil calicheamicina (Etapas 3, 100 mg, 0,068 mmol, 1 eq) en *N,N*-dimetilformamida (3,4 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Luego se añadieron secuencialmente *N,N*-diisopropiletilamina (176 µl, 1,01 mmol, 15 eq) y (1-ciano-2-etoxi-2-

oxoetilidennaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio hexafluorofosfato (COMU, 43 mg, 0,1 mmol, 1,5 eq). Después de 2 minutos, se añadió *N*-(2-aminoetil)-31-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-amida (Etapa 2, 51,4 mg, 0,08 mmol, 1,2 eq) en *N,N*-dimetilformamida (200 µl). Después de 1 hora, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (método pA) para dar el compuesto del título (16,8 mg, rendimiento del 12 %). LC/MS (método analítico B o C): Rt = 8,18 min. HRMS [M+H]⁺ calculada = 2094,7049, [M+H]⁺ observada = 2094,6902. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,03 (s, 1H), 8,01 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,86 (s, 2H), 7,01 (s, 3H), 6,80 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,30 – 6,18 (m, 1H), 6,13 (dd, *J* = 9,5, 7,1 Hz, 1H), 6,09 – 5,99 (m, 2H), 5,56 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,43 – 5,37 (m, 2H), 5,12 (dd, *J* = 13,4, 5,1 Hz, 2H), 4,94 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 4,63 – 4,47 (m, 2H), 4,27–4,13 (m, 2H), 4,11 (s, 1H), 4,08 – 3,97 (m, 1H), 3,91 (dd, *J* = 10,8, 6,1 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,78 – 3,81 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,73 – 3,63 (m, 1H), 3,63 – 3,55 (m, 7H), 3,55 – 3,46 (m, 30H), 3,41 (s, 3H), 3,25 (d, *J* = 2,3 Hz, 3H), 3,15 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,07 (s, 5H), 2,93 (d, *J* = 17,7 Hz, 1H), 2,47 – 2,38 (m, 1H), 2,36 – 2,26 (m, 7H), 2,15 – 2,06 (m, 2H), 2,01 (d, *J* = 2,7 Hz, 3H), 1,87 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 1,80 – 1,62 (m, 3H), 1,26 (dd, *J* = 6,1, 3,3 Hz, 4H), 1,24 – 1,19 (m, 2H), 1,19 – 1,12 (m, 7H), 1,09 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 0,95 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H).

Información general sobre los métodos de HPLC analítica y preparativa.

Método analítico A:

MS: Waters® Acuity® Ultra SQ Detector ESI, intervalo de escaneo 120-2040 Da.

Columna: Waters Acuity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm

Temperatura de la columna: 50 °C

Velocidad de flujo: 0,6 ml/min

Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	95	5
0,25	95	5
2	0	100
2,5	0	100
3	95	5
4	95	5

Método analítico B:

MS: Waters® Acuity® Ultra SQ Detector ESI, intervalo de escaneo 120-2040 Da,

Columna: Waters Acuity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm

Temperatura de la columna: 60 °C

Velocidad de flujo: 0,4 ml/min

Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	95	5
2	95	5
3	80	20
13	20	80
14	20	80
14,10	5	95
15	5	95
15,10	95	5
20	95	5

Método analítico C:

HRMS: AB Sciex 5600 Plus Triple Tiempo de vuelo (TOF®), intervalo de escaneo 250-2500 Da

Columna: Waters Acuity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm

Temperatura de la columna: 60 °C

Velocidad de flujo: 0,4 ml/min

Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	95	5
2	95	5
3	80	20
13	20	80
14	20	80
14,10	5	95
15	5	95
15,10	95	5
20	95	5

Método analítico D

Columna: Merck Millipore Chromolith® Flash RP-18 con protección terminal 25-2 mm.

Temperatura de la columna: 40 °C

Longitud de onda: 220 nm

Velocidad de flujo: 1,5 ml/minuto

Fase móvil A: H₂O (4 l con 1,5 ml de ácido trifluoroacético)

Fase móvil B: acetonitrilo (4 l con 0,75 ml de ácido trifluoroacético)

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	95	5
0,01	95	5
0,70	5	95
1,15	5	95
1,16	95	5
1,60	95	5

Método analítico E

Columna: Halo C18 2,1×30 mm, 2,7 µm

Detección: matriz de diodos e ionización por electropulverización positiva/negativa

Velocidad de flujo: 1,0 ml/minuto

Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,0375 % en agua

Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,018 % en acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	90	10
2,00	20	80
2,48	20	80
2,50	90	10
3,00	90	10

Método analítico F

Columna: Venusil XBP-C18, 2,1 x 50 mm, 5 µm

Detección: matriz de diodos e ionización por electropulverización positiva/negativa

Velocidad de flujo: 0,8 ml/minuto

Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,0375 % en agua

Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,018 % en acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo, minutos	% de A	% de B
0	99	1
3,40	10	90
3,85	0	100
3,86	99	1
4,51	99	1

Método de HPLC preparativa pA:

Columna: Waters XBridge™ prep C18 5 µm OBD, 19 x 100 mm

Temperatura de la columna: ambiente

Velocidad de flujo: 15 ml/min

Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

Gradiente:

Tiempo, min	% de A	% de B
0	95	5
5	95	5
8	80	20
50	20	80
52,59	20	80
52,92	5	95
55,87	5	95
56,20	95	5
60	95	5

Método de HPLC preparativa pB:

Columna: Phenomenex Luna[®] C18(2), 250×50 mm i.d., 10 µm

Longitudes de onda: 220 y 254 nm

Velocidad de flujo: 80 ml/minuto

Fase móvil A: NH₄HCO₃ 0,01 M en H₂O.

Fase móvil B: acetonitrilo

Gradiente: 30-50 % de fase móvil B durante 20 minutos

Método de HPLC preparativa pC

Columna: Phenomenex Luna[®] C18(2), 250×50 mm i.d., 10 µm

Longitudes de onda: 220 y 254 nm

Velocidad de flujo: 80 ml/minuto

Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,075 % v/v en agua

Fase móvil B: acetonitrilo

Gradiente: 10-40 % de fase móvil B durante 20 minutos

Método de HPLC preparativa pD

Columna: Phenomenex Luna[®] C18(2), 250×50 mm i.d., 10 µm

Longitudes de onda: 220 y 254 nm

Velocidad de flujo: 80 ml/minuto

Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,09 % v/v en agua

Fase móvil B: acetonitrilo

Gradiente: 15-43 % de fase móvil B durante 20 minutos

Ejemplo 4: Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo hSEZ6-1.ss1

Los ADC anti-hSEZ6-1.ss1 se prepararon de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción para pruebas adicionales *in vitro* e *in vivo*.

En este aspecto, hSEZ6-1.ss1 del Ejemplo 2 se conjugó con un enlazador del fármaco calicheamicina no escindible (Fórmula II preparado como en el Ejemplo 3) mediante un resto maleimida terminal con un grupo sulfhidrilo libre para generar el ADC contra SEZ6 descrito que se denomina ADC1 hSEZ6-1.ss1 en la presente descripción. Además, se fabricaron tres ADC contra SEZ6 de control mediante la conjugación de hSEZ6-1.ss1 con las mismas cargas útiles de calicheamicina pero que comprendían enlazadores escindibles (ADC2, ADC3 y ADC4). Finalmente, se prepararon los ADC de control que comprendían hSEZ6-1.ss1 sin la mutación S60N.

El ADC contra SEZ6 humanizado específico de sitio (hSEZ6-1.ss1) se conjugó mediante el uso de un proceso de reducción parcial modificado. El producto deseado es un ADC que está conjugado al máximo en la cisteína no emparejada (C214) en

cada región constante de LC y que minimiza los ADC que tienen una carga de fármaco mayor que 2 mientras maximiza los ADC que tienen una carga de fármaco de 2. Para mejorar aún más la especificidad de la conjugación, los anticuerpos se redujeron selectivamente mediante el uso de un proceso que comprende un agente estabilizante (por ejemplo, L-arginina) y un agente reductor suave (por ejemplo, glutatión) antes de la conjugación con el enlazador del fármaco, seguido de una etapa de diafiltración y formulación.

Más específicamente, una preparación de cada anticuerpo se redujo parcialmente en un amortiguador que contenía L-arginina 1 M/EDTA 5 mM con una concentración predeterminada de glutatión reducido (GSH), pH 8,0 durante un mínimo de 20 horas a temperatura ambiente. A continuación, todas las preparaciones se intercambiaron en un amortiguador Tris 20 mM/EDTA 3,2 mM, pH 7,0 mediante el uso de una membrana de 30 kDa (Millipore Amicon Ultra) para eliminar el amortiguador reductor. Las preparaciones parcialmente reducidas resultantes se conjugaron luego con el enlazador del fármaco calicheamicina respectivo mediante un grupo maleimida durante un mínimo de 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se ajustó el pH a 6,0 con la adición de ácido acético 0,5 M. Las preparaciones de los ADC se intercambiaron con amortiguador de diafiltración por diafiltración mediante el uso de una membrana de 30 kDa. El ADC contra SEZ6 dialfiltrado se formuló luego con sacarosa y polisorbato-20 hasta la concentración final objetivo.

Después, la formulación resultante se analizó para determinar la concentración de proteínas (mediante la medición UV), la agregación (SEC), la relación de fármaco a anticuerpo (DAR) mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) y la actividad (citotoxicidad *in vitro*). Luego se congeló y se almacenó hasta su uso.

Una representación esquemática de ADC1 hSEZ6-1.ss1 se presenta en la Figura 1 adjunta a la presente.

Ejemplo 5: Características *in vitro* del anticuerpo hSEZ6-1.ss1

Se realizaron experimentos para probar si la mutación S60N afectaba la interacción entre el AcM hSEZ6-1.ss1 y el antígeno SEZ6. En este aspecto, se midió la unión del antígeno SEZ6-his soluble a los anticuerpos SEZ6 inmovilizados en la superficie y los ADC contra SEZ6, con y sin la mutación S60N, en un Biacore T200 (chip de captura anti-humano).

Más específicamente, se hicieron fluir 5 µg/ml de IgG durante 12 segundos a 5 µl/min, lo que produjo una respuesta de inmovilización de 115-124 RU. Se inyectaron 22, 66 y 200 nM de hSEZ6-his durante 90 segundos a 30 µl/min, seguido de 300 segundos de

disociación. Las superficies se regeneraron haciendo fluir cloruro de magnesio 2 M (30 μ l/min, 30 s) al final de cada ciclo. Los sensorgramas tenían doble referencia (inyección de amortiguador y celda de flujo de control) y se exponen en la Figura 2 donde el anticuerpo con la mutación se identifica como hSEZ6-1.ss1 y el anticuerpo fuente, sin la mutación, se identifica como hSEZ6-1.ss1 original.

Además, se realizaron mediciones de afinidad mediante el uso de un Biacore T200 para determinar las características de unión de hSEZ6-1.ss1 que comprende S60N. En este aspecto, se fabricaron y se purificaron los constructos Fab del anticuerpo hSEZ6-1.ss1, con y sin la mutación S60N. La unión de los constructos Fab al ligando SEZ6-His humana soluble inmovilizado en la superficie se comparó luego en un Biacore T200 (chip de captura anti-His). Más específicamente, se hicieron fluir 2 μ g/ml de SEZ6-His humana a través del chip durante 12 segundos a 5 μ l/min, lo que produjo una respuesta de inmovilización de 45-66 RU. Se produjeron inyecciones de 22, 66 y 200 nM de Fab durante 90 segundos a 30 μ l/min, seguidas de 400-450 segundos de disociación. Las superficies se regeneraron haciendo fluir glicina 10 mM, pH 1,5 durante 60 segundos a 30 μ l/min. Los sensorgramas tenían doble referencia (inyección de amortiguador y celda de flujo de control). Los resultados se muestran en la Tabla 4 inmediatamente a continuación.

Tabla 4

Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	hSEZ6-His Kd (nM)	Rmáx (RU)
Fab de tipo salvaje	1,1E+06	0,006	5,8	35,2
Fab de MutA (S60N)	1,3E+06	0,006	4,8	4,0

Como se ve en la Figura 2, resulta que la mutación S60N y la eliminación de los sitios de glicosilación en la región variable de la cadena pesada no altera materialmente las propiedades de unión de los anticuerpos hSEZ6-1.ss1 en comparación con el anticuerpo original que carece de la mutación. De manera similar, las medidas de afinidad mostradas en la Tabla 4 demuestran que la mutación introducida no impacta de manera adversa en la unión del anticuerpo usado en el ADC descrito. Como tal, la posición potencialmente desestabilizadora puede modificarse sin comprometer la eficacia farmacéutica de la molécula.

Ejemplo 6: Los ADC hSEZ6 destruyen eficazmente las células que expresan hSEZ6 *in vitro*

Para determinar si los ADC anti-SEZ6 de la invención pueden mediar eficazmente la administración de los agentes citotóxicos conjugados a las células vivas, se realizó un ensayo de destrucción celular *in vitro* mediante el uso de los ADC anti-SEZ6 producidos en el Ejemplo 4 anterior.

Se colocaron en las placas las suspensiones de células individuales de las células HEK293T que sobreexpresan hSEZ6 o las células HEK293T vírgenes a razón de 500 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos BD (BD Biosciences). Un día después, se añadieron a los cultivos diversas concentraciones de ADC purificado conjugado con calicheamicina. Las células se incubaron durante 96 horas. Después de la incubación, las células viables se enumeraron mediante el uso de CellTiter-Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los recuentos de luminiscencia sin procesar mediante el uso de cultivos que contienen las células no tratadas se establecieron como los valores de referencia del 100 % y todos los demás recuentos se calcularon como un porcentaje del valor de referencia.

La Figura 3 muestra que todas las células que expresan hSEZ6 tratadas eran mucho más sensibles a los ADC anti-SEZ6 en comparación con las células HET293T vírgenes, lo que demuestra la especificidad de los ADC al antígeno SEZ6.

Los resultados anteriores demuestran la capacidad de los ADC anti-SEZ6 para mediar específicamente la internalización y la administración de las cargas útiles citotóxicas conjugadas directamente a las células que expresan SEZ6.

Ejemplo 7: Farmacocinética de ADC en ratones inmunodeprimidos

Se evaluó la farmacocinética (PK) de ADC1 hSEZ6-1.ss1, ADC2 hSEZ6-1.ss1 y ADC3 hSEZ6-1.ss1 en ratones NOD SCID. Los ratones (n=4 hembras por grupo) se asignaron al azar en grupos de tratamiento que tenían el mismo peso corporal promedio y luego se trataron con la misma cantidad de ADC mediante una única inyección intravenosa (volumen de 100 µl). Los ADC se administraron conjuntamente cada uno con 10 mg/kg de anticuerpo HulgG1 no conjugado para saturar la depuración mediada por FcγR y proporcionar una exposición adecuada a ADC. Se recolectaron muestras de suero a los 5 min, 4, 24, 72, 120, 168, 216 y 336 horas después de cada dosis, y se evaluaron las concentraciones de anticuerpos totales (AcT) y ADC mediante inmunoensayo MSD. Los parámetros farmacocinéticos, que incluyen las concentraciones máximas (C_{máx}), la exposición (área bajo la curva o AUC) evaluada desde el tiempo=0 hasta 14 días después de la administración) y la vida media, se evaluaron mediante el uso de los métodos de análisis no compartimentales.

La farmacocinética en suero de ADC y AcT disminuyó biexponencialmente para todos los ADC y se observaron concentraciones máximas ($C_{\text{máx}}$) 5 minutos después de la dosis. No hubo diferencias significativas en la exposición a ADC (AUC 0-14 días) entre los ADC contra SEZ6 probados. La vida media terminal en suero del ADC fue similar entre los ADC. La estabilidad del ADC se midió por la relación de AcT a las exposiciones de ADC, y fue similar para los compuestos probados, variando de 1,4 a 1,6. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la farmacocinética de ADC1 hSEZ6-1.ss1, ADC2 hSEZ6-1.ss1 y ADC3 hSEZ6-1.ss1 son comparables en los ratones NOD SCID.

Ejemplo 8: Los conjugados de fármaco y anticuerpo hSEZ6-1.ss1 suprimen el crecimiento tumoral *in vivo*

Se realizaron experimentos *in vivo* para confirmar la capacidad de destrucción celular de ADC1 hSEZ6-1.ss1, ADC2 hSEZ6-1.ss1 y ADC3 hSEZ6-1.ss1 demostrada en el Ejemplo 6. Con este fin, los ADC específicos de sitio dirigidos a SEZ6, preparados como se expone en los ejemplos anteriores, se probaron para determinar los efectos terapéuticos *in vivo* en ratones NOD SCID inmunodeprimidos que portan xenoinjerto derivado del paciente (PDX) subcutáneo de tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) que tienen expresión de la proteína de la superficie celular SEZ6. Los conjugados anti-SEZ6, ADC1 hSEZ6-1.ss1, ADC2 hSEZ6-1.ss1 y ADC3 hSEZ6-1.ss1, se evaluaron cada uno en dos modelos diferentes de SCLC.

Las líneas de PDX de SCLC, LU95 y LU149 se inyectaron cada una como un inóculo de células disociada debajo de la piel, cerca de la región de la almohadilla de grasa mamaria, y se midieron semanalmente con calibradores ($\text{volumen elipsoide} = a \times b^2/2$, donde a es el diámetro de largo, y b es el diámetro corto de una elipse). Después que los tumores crecieron hasta un tamaño promedio de 130-200 mm³ (intervalo, 100-300 mm³), los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento ($n=5$ ratones por grupo) de promedios de volumen tumoral iguales. Los ratones (5 por grupo) se trataron con dosis únicas idénticas de vehículo (glucosa al 5 % en agua estéril) o preparaciones de ADC de HulgG1 o SEZ6 mediante una inyección intraperitoneal (volumen de 100 μ l). El ADC contra SEZ6 se administró conjuntamente con 10 mg/kg de anticuerpo HulgG1 desnudo para linealizar la farmacocinética.

Efectos terapéuticos evaluados por el volumen tumoral semanal (con calibradores como anteriormente) y las medidas de peso. Los criterios de valoración para los ratones individuales o los grupos de tratamiento incluían la evaluación de la salud (cualquier signo de enfermedad), la pérdida de peso (más del 20 % de pérdida de

peso desde el inicio del estudio) y la carga tumoral (volúmenes tumorales $> 1,000 \text{ mm}^3$). La eficacia se controló mediante las mediciones semanales del volumen tumoral (mm^3) hasta que los grupos alcanzaron un promedio de aproximadamente $800\text{-}1,000 \text{ mm}^3$. Los volúmenes tumorales se calcularon como un promedio con el error estándar del promedio para todos los ratones en el grupo de tratamiento y se representaron gráficamente en función del tiempo (días) desde el tratamiento inicial. Los resultados de los tratamientos se representan en las Figuras 4A y 4B donde se muestran los volúmenes tumorales promedios con el error estándar de la media (SEM) en 5 ratones por grupo de tratamiento.

Los ADC de unión a SEZ6 conjugados con calicheamicina (ADC1 hSEZ6-1.ss1, ADC2 hSEZ6-1.ss1 y ADC3 hSEZ6-1.ss1) se evaluaron en ratones que llevaban PDX-LU95 (Figura 4A) o PDX-LU149 (Figura 4B) de SCLC. El ADC1 con enlazador no escindible tuvo una eficacia similar o mayor en comparación con el ADC2 con enlazador escindible mientras que el ADC3 con enlazador escindible tuvo una mayor eficacia en comparación con el ADC1 a 2 mg/kg . En cualquier evento, el ADC1 hSEZ6-1.ss1 y el ADC3 hSEZ6-1.ss1 pueden lograr respuestas duraderas durante 50 días o más en PDX de SCLC. La respuesta fue específica de ADC contra SEZ6, ya que no se observó respuesta después del tratamiento con los ADC no unidos (HulgG1) conjugados con los mismos enlazadores del fármaco calicheamicina (datos no mostrados).

Dichos resultados demuestran que el ADC1 hSEZ6-1.ss1, fabricado como se establece en la presente descripción, tiene el potencial de ser farmacéuticamente eficaz para retardar el crecimiento de las células de cáncer de pulmón de células pequeñas.

Ejemplo 9: El ADC1 hSEZ6-1.ss1 exhibe un sólido margen de seguridad

Se realizó un análisis para determinar el margen de seguridad proporcionado por el ADC1 hSEZ6-1.ss1.

En este aspecto, el ADC1 hSEZ6-1.ss1, el ADC2 hSEZ6-1.ss1 y el ADC3 hSEZ6-1.ss1 comprenden un AcM dirigido idéntico (hSEZ6-1.ss1) y una carga (N-acetil gamma calicheamicina), con diferencias en el enlazador del fármaco. El ADC1 hSEZ6-1.ss1 es único porque comprende un enlazador no escindible en comparación con los otros enlazadores de fármacos basados en dipéptidos susceptibles a catepsina B. Los ADC contra SEZ6 se evaluaron en cuatro modelos de PDX en ratón de SCLC de alta expresión de SEZ6 (LU64, LU86, LU95 y LU149), y en un estudio exploratorio de toxicidad de dosis repetidas en monos cynomolgus.

Se usó un modelo de PK/PD semi-mecanicista basado en el crecimiento del tumor no tratado y los datos de la respuesta del tumor tratado con ADC contra SEZ6 en ratón para predecir las concentraciones estáticas tumorales (TSC) que corresponden a una concentración de ADC que da como resultado el estasis tumoral en los pacientes. Posteriormente, se simuló la PK humana basándose en los datos de la PK del mono cynomolgus. A continuación, se usaron las predicciones de la PK humana para estimar la dosis necesaria para lograr una concentración en plasma en el intervalo de la dosis en los pacientes que sea equivalente a la TSC. Los márgenes de seguridad se estimaron mediante la comparación de las exposiciones de ADC a la dosis máxima tolerada (MTD) en monos cynomolgus con la exposición a la dosis eficaz prevista en humanos. Este análisis se repitió para cada modelo de PDX de pulmón evaluado (LU64, LU86, LU95 y LU149).

La Tabla 5 proporciona el margen de seguridad previsto para cada uno de los ADC contra SEZ6. Basado en este análisis, se predijo que el ADC1 hSEZ6-1.ss1 era más tolerable que los otros ADC contra SEZ6 (ADC2 hSEZ6-1.ss1, ADC3 hSEZ6-1.ss1) conjugados con la misma carga útil pero con enlaces escindibles. Este análisis predijo un margen de seguridad de aproximadamente 10 para el ADC1 hSEZ6-1.ss1 que es considerablemente más alto que los dos constructos con enlaces escindibles.

Tabla 5

Compuesto	Margen de seguridad estimado
ADC1 hSEZ6-1.ss1	10
ADC2 hSEZ6-1.ss1	0,3
ADC3 hSEZ6-1.ss1	5,5

El mayor margen de seguridad previsto en humanos basado en los datos obtenidos en monos cynomolgus y la correspondiente flexibilidad de dosificación indican que el ADC1 hSEZ6-1.ss1 es un potente candidato terapéutico.

Ejemplo 10: El ADC1 hSEZ6-1.ss1 es particularmente activo en SCLC

Para demostrar aún más la eficacia potencial del ADC descrito, se realizaron ensayos específicos de toxina mediante el uso de varias líneas celulares de xenoinjerto tumoral. Inicialmente, se evaluaron las líneas celulares de PDX de SCLC, BR, CR, GA, NSCLC y PA mediante el análisis de microarreglo para determinar el nivel de

expresión respectivo del antígeno SEZ6 (Figura 5A) y CD46, un antígeno de control positivo conocido (Figura 5B). El análisis de microarreglo se realizó mediante el uso del ensayo Affymetrix ClariomD en muestras de ARN purificado derivadas de PDX humano. Una revisión de las Figuras 5A y 5B muestra que, mientras que la expresión de SEZ6 está regulada positivamente en los tumores de SCLC en comparación con otros tipos de tumores, el control de antígeno positivo CD46 exhibió niveles de expresión de ARNm altos de manera consistente en el panel de xenoinjertos derivados del paciente (PDX). Por consiguiente, el antígeno CD46 se usó como una diana de ADC sustituta para medir el impacto del nuevo enlazador del fármaco calicheamicina (Fórmula II) descrito en varios tipos de tumores.

En este sentido, N149, un anticuerpo de CD46 humanizado (documento núm. U.S.P.N 10,017,565 B2) se conjugó con el enlazador del fármaco calicheamicina que se establece en la presente descripción o con un control de enlazador del fármaco pirrolobenzodiazepina (PBD). Los ADC se generaron sustancialmente como se expone en el Ejemplo 4 anterior. Después de la preparación, los ADC CD46 se congelaron y se almacenaron hasta su uso.

Las células de PDX se inocularon en el costado de los ratones NOD-SCID. Cuando los tumores alcanzaron entre 100-300 mm³, las preparaciones de ADC PBD se introdujeron como una dosis única de 1,6 mg/kg (Figura 5C), mientras que las preparaciones de ADC de calicheamicina se administraron como una dosis única de 8 mg/kg para todos los tipos de tumores distintos del PDX de SCLC (Figura 5D). Para el PDX de SCLC, la preparación de ADC de calicheamicina se administró como una dosis de 2 mg/kg o 4 mg/kg (Figura 5D). A continuación, se controlaron los tumores para detectar los cambios en comparación con la preparación de ADC no dirigida con la misma carga. El delta tiempo hasta la progresión del tumor (dTTP) se calculó mediante la resta del tiempo de progresión para el ADC no dirigido del tiempo de progresión para el agente de dirección. La progresión del tumor se definió como el tiempo en el que la medición observada vuelve a crecer al menos 100 mm³ más que el volumen nadir posterior al tratamiento. Cada punto de datos en las Figuras 5C y 5D representan una línea celular de PDX individual del tipo de tumor respectivo.

Como se muestra en la Figura 5C, las preparaciones de ADC PBD proporcionaron una respuesta tumoral relativamente uniforme independientemente del tipo de tumor de PDX. En particular, la susceptibilidad del PDX de SCLC a la destrucción por la toxina PBD fue en gran parte equivalente a la de las otras líneas de células tumorales. En marcado contraste, las líneas celulares de PDX de SCLC demostraron ser mucho más

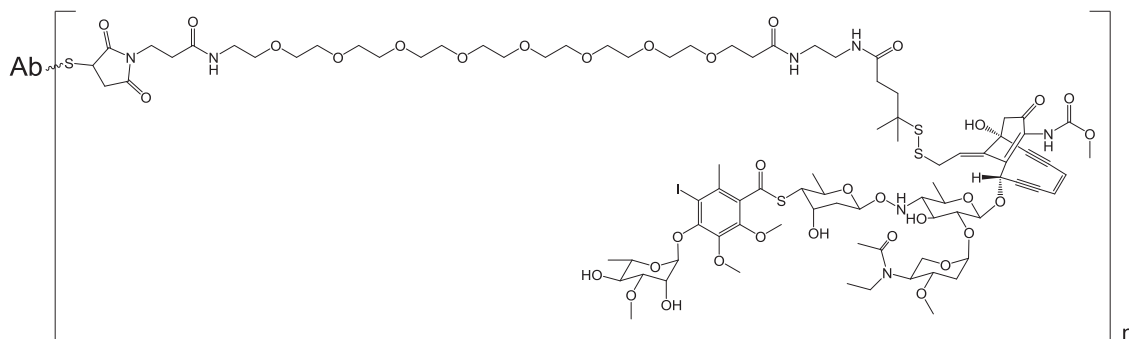
susceptibles a la destrucción por los ADC de calicheamicina que las otras líneas celulares de PDX (Figura 5D). Más específicamente, después de una dosis única de 8 mg/kg del ADC de calicheamicina, la mayoría de los xenoinjertos derivados del paciente de tumores de BR, CR, GA y NSCLC mostraron una respuesta mínima o nula. Hubo una mezcla de respuestas en los tumores pancreáticos, pero incluso los tumores pancreáticos mostraron respuestas mínimas (<25 días dTTP) en la mayoría de las líneas celulares probadas. Por el contrario, las dosis más bajas de 2 mg/kg (círculos negros) o 4 mg/kg (círculos blancos) del ADC de calicheamicina redujeron consistentemente el crecimiento tumoral de SCLC sustancialmente más que las dosis más altas de ADC de calicheamicina logradas en otros tumores de PDX. Además, la mayoría de los tumores de SCLC mostraron retrasos en el crecimiento de más de 40 días en comparación con un anticuerpo no dirigido que portaba la misma carga (datos no mostrados).

Estos datos sugieren que los tumores de SCLC son más sensibles a una carga de calicheamicina que a otras cargas que dañan el ADN. Este resultado fue inesperado, ya que se esperaba que la carga de calicheamicina proporcionara resultados similares a los observados con la carga de PBD.

MODALIDADES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a SEZ6 humana en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4.
2. El anticuerpo de la modalidad 1, en donde el anticuerpo está conjugado con una carga útil de calicheamicina.
3. El anticuerpo de la modalidad 2 en donde la carga útil de calicheamicina comprende la N-Ac calicheamicina.
4. El anticuerpo de la modalidad 3, en donde la carga útil de calicheamicina comprende la Fórmula II.
5. Un método para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas que comprende administrar un anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-4 a un sujeto que lo necesite.
6. Un kit que comprende uno o más recipientes que contienen un anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-4.
7. El kit de la modalidad 6 comprende además una etiqueta o un prospecto asociado con uno o más recipientes que indican que el anticuerpo es para tratar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas.

8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-4.
9. Un kit que comprende uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica de la modalidad 8.
10. El kit de la modalidad 9 que comprende además una etiqueta o un prospecto asociado con uno o más recipientes que indica que la composición farmacéutica es para tratar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas.
11. Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un anticuerpo de cualquiera de las modalidades 1-4.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de la modalidad 11.
13. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11 o el vector de la modalidad 12.
14. Un ADC contra SEZ6 de la estructura:



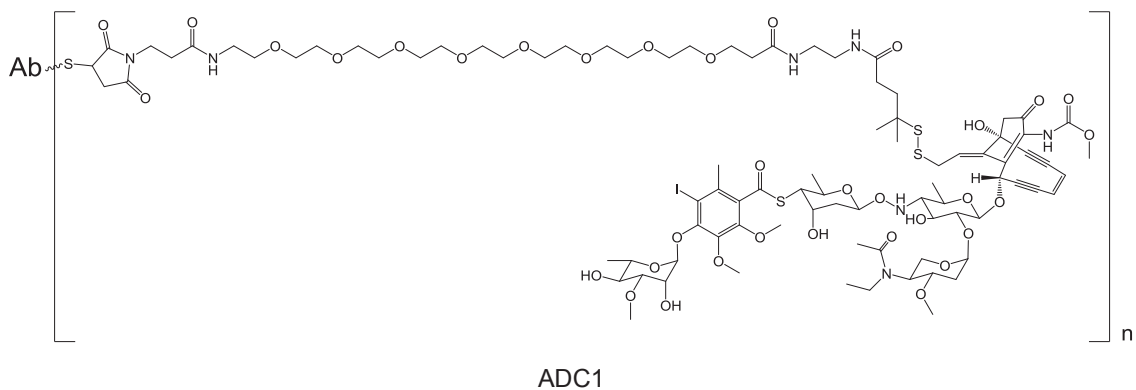
ADC1

en donde el Ac comprende un anticuerpo anti-SEZ6 que tiene una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 y en donde n es 2.

15. Un método para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas que comprende administrar un ADC contra SEZ6 de la modalidad 14 a un sujeto que lo necesite.
16. Un kit que comprende uno o más recipientes que contienen el ADC contra SEZ6 de la modalidad 14.
17. El kit de la modalidad 16 que comprende además una etiqueta o un prospecto asociado con uno o más recipientes que indican que el ADC contra SEZ6 es para tratar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas.
18. Una composición farmacéutica que comprende el ADC contra SEZ6 de la modalidad 14.

19. La composición farmacéutica de la modalidad 18, en donde el ADC contra SEZ6 de la reivindicación 14 es la especie de ADC predominante.
20. La composición farmacéutica de la modalidad 19 en donde la especie de ADC predominante comprende más de aproximadamente el 70 % de las especies de ADC presentes en la composición.
21. La composición farmacéutica de la modalidad 19 en donde la especie de ADC predominante comprende más de aproximadamente el 80 % de las especies de ADC presentes en la composición.
22. La composición farmacéutica de la modalidad 19 en donde la especie de ADC predominante comprende más de aproximadamente el 90 % de las especies de ADC presentes en la composición.
23. Un kit que comprende uno o más recipientes que contienen cualquiera de las composiciones farmacéuticas de las modalidades 18-22.
24. El kit de la modalidad 23 que comprende además una etiqueta o un prospecto asociado con uno o más recipientes que indica que la composición farmacéutica es para tratar a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas.
25. Un método para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas que comprende la administración de cualquiera de las composiciones farmacéuticas de las modalidades 18-22.
26. Un método para reducir las células iniciadoras de tumores en una población de células tumorales, en donde el método comprende poner en contacto una población de células tumorales que comprende las células iniciadoras de tumores y las células tumorales distintas de las células iniciadoras de tumores, con un ADC contra SEZ6 de la modalidad 14 mediante el cual la frecuencia de las células iniciadoras de tumores se reduce.
27. El método de la modalidad 26, en donde el contacto se realiza *in vivo*.
28. El método de la modalidad 26, en donde el contacto se realiza *in vitro*.
29. Un método para administrar una citotoxina a una célula que comprende poner en contacto la célula con un ADC contra SEZ6 de la modalidad 14.
30. Un método para producir un ADC de la modalidad 14 que comprende la etapa de conjugar un anticuerpo hSEZ6-1.ss1 que tiene una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 con un enlazador del fármaco que comprende la Fórmula II.
31. El método de la modalidad 30 que comprende además la etapa de liofilizar el ADC.

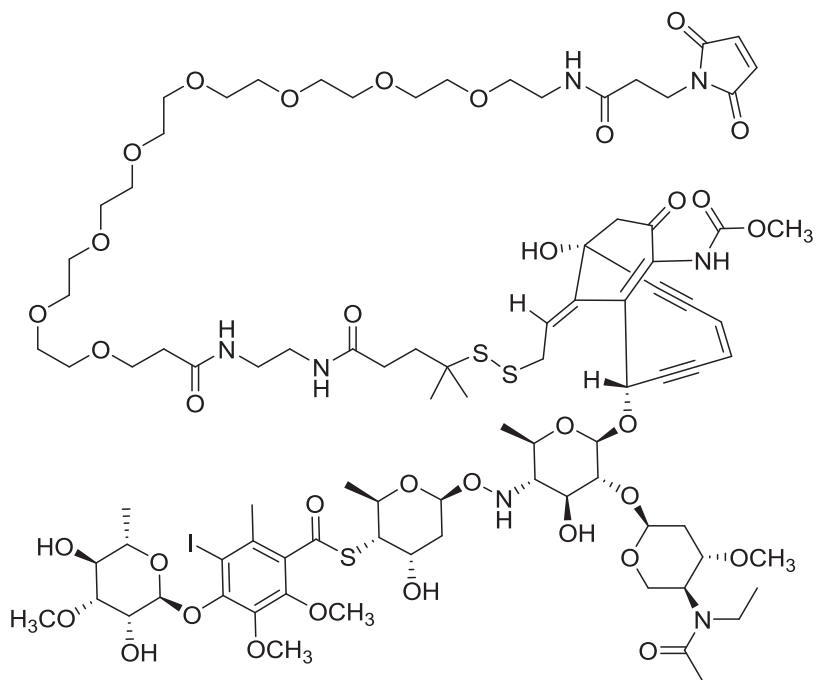
32. Un método para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un ADC contra SEZ6 que tiene un margen de seguridad mayor que 6, en donde el ADC contra SEZ6 comprende la estructura:



en donde el Ac comprende un anticuerpo anti-SEZ6 que tiene una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 y en donde n es 2.

33. El método de la modalidad 32 en donde el margen de seguridad es de aproximadamente 10.

34. Un enlazador del fármaco calicheamicina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, que comprende la estructura:



Fórmula II.

Los expertos en la técnica apreciarán además que la presente invención puede materializarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o los atributos centrales de esta. Dado que la descripción anterior de la presente invención describe únicamente las modalidades ilustrativas de esta, debe entenderse que se contemplan otras variaciones dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las modalidades particulares que se han descrito en detalle en la presente descripción. Más bien, se debe hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas como indicativas del alcance y el contenido de la invención.