

ANTICUERPO ANTI-DLL3, CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO Y SU USO FARMACÉUTICO

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-DLL3, a su conjugado anticuerpo-
5 fármaco y a su uso farmacéutico.

Antecedentes de la Invención

Las declaraciones aquí contenidas simplemente proporcionan información de referencia relacionada con la presente invención y no necesariamente constituyen el estado de la técnica.

El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) es un tipo de cáncer de pulmón
10 relativamente maligno, que representa entre el 10% y el 15% de todos los casos de cáncer de pulmón. Los tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas crecen rápidamente y metastatizan con facilidad, con una tasa de supervivencia a cinco años inferior al 7%. La quimioterapia combinada de platino/etopósido se utiliza a menudo para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas. Los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas
15 responden inicialmente bien a la quimioterapia, pero son muy propensos a desarrollar resistencia y recaída. En los últimos años, inmunoterapias como los anticuerpos PD-L1 y PD-1 han demostrado cierta eficacia en pacientes con cáncer de pulmón microcítico, con una tasa de efectividad global de aproximadamente el 15%. Aún no se han desarrollado fármacos de terapia dirigida específicos para esta enfermedad.

El DLL3 es un ligando que inhibe Notch. En condiciones normales, el DLL3 se encuentra
20 en el aparato de Golgi, pero en células cancerosas (como las células del cáncer de pulmón microcítico), el DLL3 puede desplazarse a la superficie celular y unirse a Notch en cis, impidiendo la unión intercelular y la endocitosis de Notch en las células diana. Esto inhibe la vía de señalización de Notch y promueve el crecimiento de células tumorales. El DLL3 se expresa
25 principalmente en tumores nerviosos o neuroendocrinos, como el CPCP, el cáncer neuroendocrino de células grandes, los tumores neuroendocrinos gastrointestinales, el cáncer de vejiga microcítico, el glioblastoma multiforme, el cáncer de próstata metastásico por castración, el melanoma, etc. En particular, más del 80% de los casos de CPCP presentan expresión de DLL3, que no se expresa en tejido pulmonar normal ni en tejido paracanceroso.
30 Esta expresión diferencial convierte a DLL3 en una diana terapéutica muy potencial para el tratamiento del CPCP.

Las toxinas basadas en exatecán son derivados de la camptotecina que inhiben la topoisomerasa I y pueden inhibir selectivamente la replicación del ADN en células tumorales en etapas proliferativas. Además, las toxinas basadas en exatecán también presentan una buena

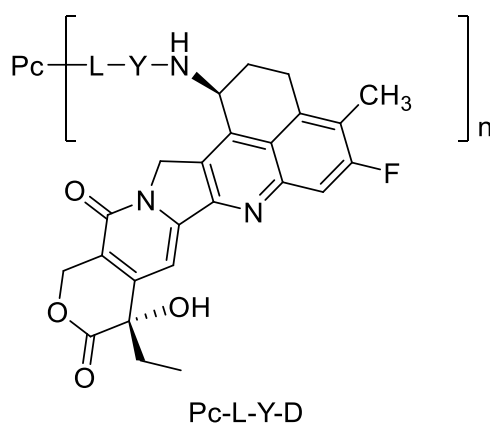
permeabilidad de membrana, lo que les permite penetrar en las células cancerosas muertas y continuar destruyendo las células cancerosas adyacentes; clínicamente, tienen efectos secundarios evidentes.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs) se obtienen mediante la unión de anticuerpos a fármacos biológicamente activos mediante un ligador. Los ADCs aprovechan al máximo la especificidad de los anticuerpos para unirse a antígenos en la superficie de células normales y tumorales, así como la alta eficacia de los fármacos (como los agentes citotóxicos), evitando inconvenientes como la baja eficacia de los anticuerpos, la excesiva toxicidad y los efectos secundarios. El conjugado anticuerpo-fármaco puede destruir células tumorales con mayor precisión y tiene un efecto reducido sobre las células normales en comparación con los fármacos quimioterapéuticos convencionales anteriores.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-DLL3, a su conjugado anticuerpo-fármaco y a su uso farmacéutico. Más específicamente, la presente invención proporciona ADC de diversos anticuerpos anti-DLL3 de secuencias completamente nuevas conjugados con una toxina basada en exatecán.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cuya estructura se representa por la fórmula general Pc-L-Y-D:



en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

i) la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 57; y

la región variable de cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27;

donde SEQ ID NO: 57 está representada por $\text{PLYX}_1\text{YGRSYNX}_2\text{VAY}$, donde X_1 es Y o H;

5 X_2 es A o G; o

ii) la región variable de la cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18; y

10 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21;

Y es $-\text{O}-(\text{CR}^a\text{R}^b)_m-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{C}(\text{O})-$, donde R^a y R^b son idénticos o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de deuterio, halógeno y alquilo C1-6;

15 R^1 es haloalquilo C1-6 o cicloalquilo C3-6;

R^2 se selecciona del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, haloalquilo C_{1-6} y cicloalquilo C_{3-6} ;

o R^1 y R^2 , junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman cicloalquilo C_{3-6} ;

m es un número entero de 0 a 4;

20 n es de 1 a 10 (incluyendo números enteros y decimales);

L es un enlazador.

En algunas modalidades, en el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o en su sal farmacéuticamente aceptable, n es el número promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo, que puede ser un número entero o un decimal. En algunas modalidades, n es 1-10, o 2-10, o 3-10, o 4-10, o 5-10, o 6-10, o 7-10, o 8-10, o 1-9, o 2-9, o 3-9, o 4-9, o 5-9, o 6-9, o 7-9, o 1-8, o 2-8, o 3-8, o 4-8, o 5-8, o 6-8, o 1-7, o 2-7, o 3-7, o 4-7, o 5-7, o 1-6, o 2-6, o 3-6, o 4-6, o 1-5, o 2-5, o 3-5, o 1-4, o 2-4, o 1-3. En algunas modalidades, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

30 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 30 o 31; y

- 5 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el anticuerpo anti-DLL3
10 comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

la región variable de la cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24. y

- 15 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el anticuerpo anti-DLL3
20 comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

la región variable de la cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30; y

- 25 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende
30 una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

la región variable de la cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31; y

la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27.

5 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-
10 fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región marco de inmunoglobulina humana (FR).

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

15 la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 57, donde SEQ ID NO: 57 está representada por $\text{PLYX}_1\text{YGRSYNX}_2\text{VAY}$, donde X_1 es Y o H; X_2 es A o G; y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo
20 que consiste en 1E, 49A y 94S;

la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden una mutación inversa 43I. Los sitios de mutación inversa descritos
25 anteriormente siguen el esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 1E, 27Y, 30T, 38K, 43K, 48I, 67A, 68A, 69L, 71V, 73K, 75S, 76N y 93A; y

la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 36L, 43S, 44F, 46G, 69A, 71Y y 85D. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente siguen el esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden mutaciones inversas de 1E, 68A, 69L, 71V, 73K, 75S y 76N; y

la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden las mutaciones inversas 36L, 46G, 69A, 71Y y 85D. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad específica, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. La región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden mutaciones inversas de 1E y 94S.

la región variable de cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, una HCDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, 30 o 31, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 1E, 49A y 94S;

5 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden una mutación inversa 43I. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

10 En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

15 la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 1E, 49A y 94S; y

20 la región variable de cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27, y las FR de la región variable de cadena ligera comprenden una mutación inversa 43I. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:

25 la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 1E, 49A y 94S;

30 la región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden una mutación inversa 43I. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

En una modalidad, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

5 la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y las FR de la región variable de cadena pesada comprenden una o más mutaciones inversas seleccionadas del grupo que consiste en 1E, 49A y 94S; y

10 La región variable de la cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27. Las FR de la región variable de la cadena ligera comprenden una mutación inversa 43I. Los sitios de mutación inversa descritos anteriormente se ajustan al esquema de numeración de Kabat.

15 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

i) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 14, 50, 51, 52, 53 o 54; y/o

20 la región variable de cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 15, 55 o 56; o

25 ii) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44; y/o

la región variable de la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 13, 45, 46, 47, 48 o 49.

30 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende:

i) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14; y/o

5 la región variable de la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15; o

ii) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 o 54; y/o

10 la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 55 o 56; o

15 iii) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12; y/o

la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13; o

20 iv) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44; y/o

la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48 o 49.

25 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende:

30 i) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 50; y/o

la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 55; o

ii) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43; y/o

la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 90%,
5 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 48.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

10 i) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y/o la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; o

ii) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 y 54, y/o la
15 región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de 55 o 56; o

iii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y/o la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; o

iv) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos
20 seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 43, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 44, y/o la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 48, 45, 46, 47 y 49.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado
25 anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende:

la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; o

30 La región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 48.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde: la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 55.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 es un fragmento de anticuerpo, donde el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fd, Fv, scFv, dsFv, diacuerpo o dominio. En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región constante de cadena ligera y una región constante de cadena pesada.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región constante de una cadena λ o una cadena κ .

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 y una región constante de cadena ligera de una cadena κ . En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende:

la región constante de la cadena pesada comprende la secuencia SEQ ID NO: 28, y/o la región constante de la cadena ligera comprende la secuencia SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 60, y/o la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 61; o

la cadena pesada comprende una secuencia con al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 58, y/o la cadena ligera comprende una secuencia con al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 59.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 comprende:

la cadena pesada comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 60, y/o la cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 61; o

la cadena pesada comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 58, y/o la cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 59.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo anti-DLL3 presenta al menos una de las siguientes propiedades:

a) el anticuerpo anti-DLL3 se une a DLL3 humana o a un epítipo del mismo con un valor de KD de ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.9 nM, ≤ 0.8 nM, ≤ 0.7 nM, ≤ 0.6 nM, ≤ 0.5 nM, o ≤ 0.4 nM, según lo determinado por Biacore;

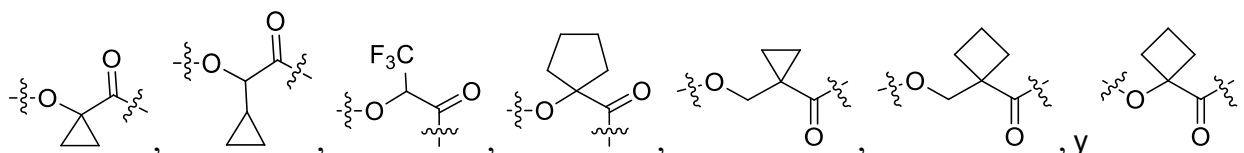
b) El anticuerpo anti-DLL3 se une a células H1184 que expresan DLL3 con una EC50 de ≤ 3 nM, una EC50 de ≤ 2 nM, una EC50 de ≤ 1 nM, una EC50 de ≤ 0.5 nM, una EC50 de ≤ 0.2 nM, una EC50 de ≤ 0.1 nM, una EC50 de ≤ 0.09 nM, una EC50 de ≤ 0.08 nM, una EC50 de ≤ 0.07 nM o una EC50 de ≤ 0.06 nM, según lo determinado por FACS.

c) El anticuerpo anti-DLL3 puede ser endocitosado por una célula que expresa DLL3. y

d) el anticuerpo anti-DLL3 se une a DLL3 o a un epítipo de este con una EC50 de ≤ 0.1 nM, ≤ 0.09 nM, ≤ 0.08 nM, ≤ 0.07 nM, ≤ 0.06 nM, ≤ 0.05 nM o ≤ 0.04 nM, determinada mediante ELISA; y

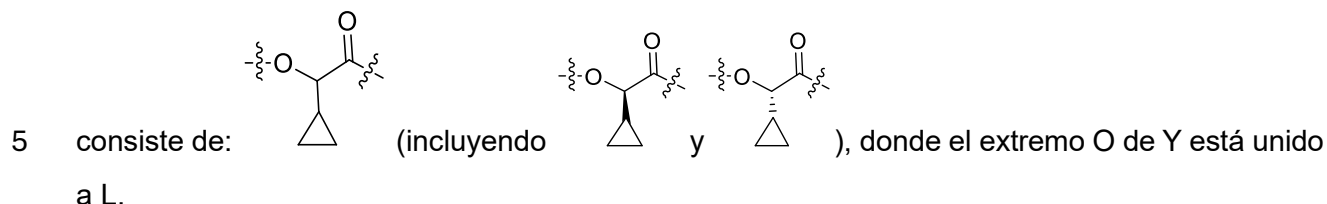
e) el anticuerpo anti-DLL3 reconoce un epítipo de DLL3 diferente al de un anticuerpo positivo (invención, BI-764532).

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde Y se selecciona del grupo que consiste en:



donde el extremo O de Y está unido a L.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde Y se selecciona del grupo que



En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L es $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, donde:

10 L^1 se selecciona del grupo que consiste en $-(\text{succinimid-3-il-N})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$, $\text{NR}^3-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$ y $-\text{C}(\text{O})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, donde W se selecciona del grupo que consiste en C_{1-6} Alquileo y alquileo C_{1-6} -cicloalquilo C_{3-6} , donde el alquileo C_{1-6} y el alquileo C_{1-6} -cicloalquilo C_{3-6} están sustituidos opcionalmente, independientemente, con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, amino, alquilo, cloroalquilo, alquilo deuterado, alcoxi y cicloalquilo;

15 L^2 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ y un enlace químico, donde p es un número entero de 1 a 20;

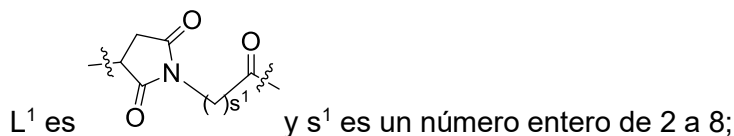
20 L^3 es un residuo peptídico que consta de 2 a 7 residuos de aminoácidos, en donde los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico, y están opcionalmente sustituidos además con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, amino, alquilo, cloroalquilo, alquilo deuterado, alcoxi y cicloalquilo;

L^4 se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ y un enlace químico, donde t es un número entero de 1 a 6;

25 R^3 , R^4 y R^5 son idénticos o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquilo deuterado e hidroxialquilo;

R^6 y R^7 son idénticos o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, halógeno, alquilo, haloalquilo, alquilo deuterado e hidroxialquilo.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L es $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, donde:



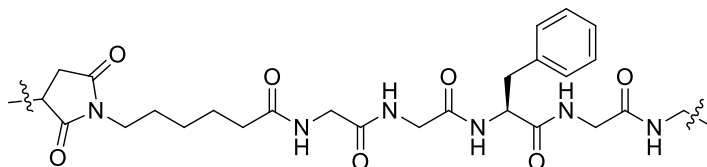
L^2 es un enlace químico;

- 5 L^3 es un residuo tetrapeptídico; Preferentemente, L^3 es un residuo tetrapeptídico compuesto por glicina-glicina-fenilalanina-glicina; L^4 es $-\text{NH}(\text{CH}_2)_t-$, y t es 1 o 2;

donde el extremo L^1 está unido a Pc.

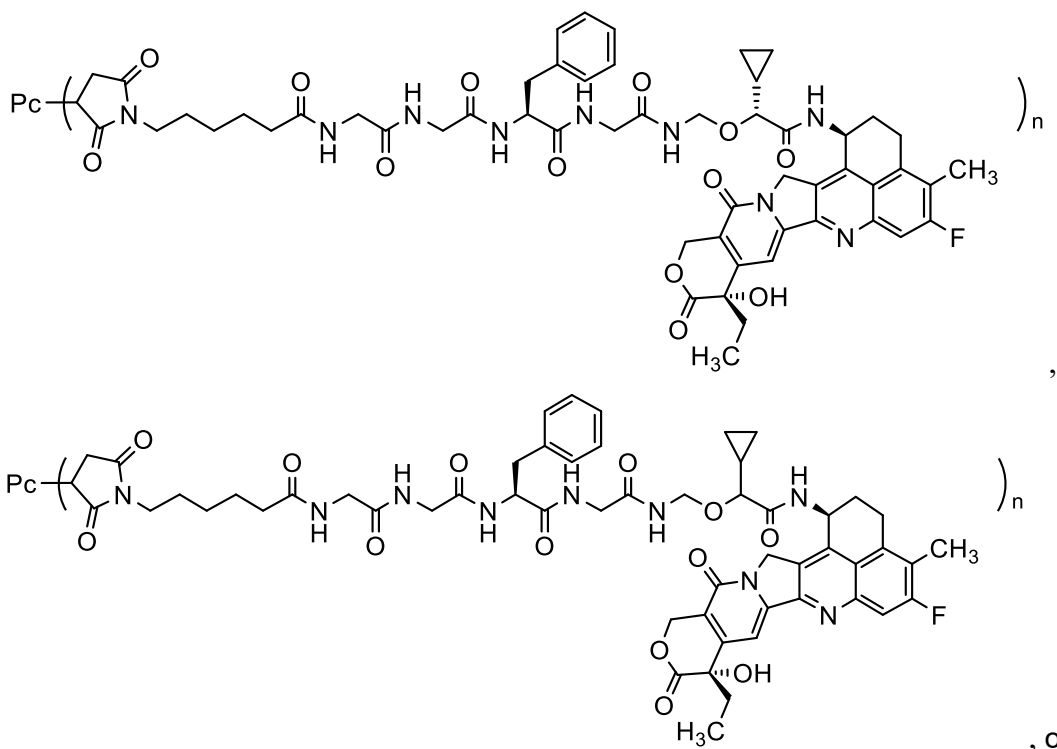
En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L tiene la siguiente estructura:

10

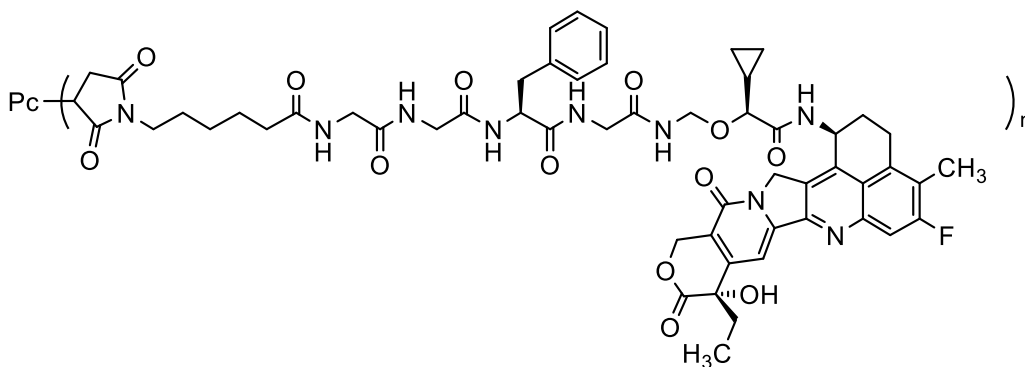


En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene la siguiente estructura:

15



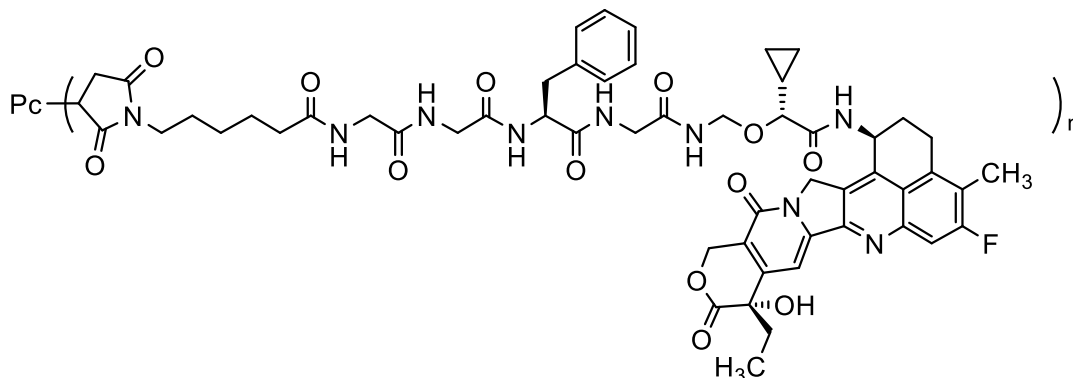
15



en donde

Pc es el anticuerpo anti-DLL3 según cualquiera de las opciones anteriores; n es de 1 a 10.

- 5 En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



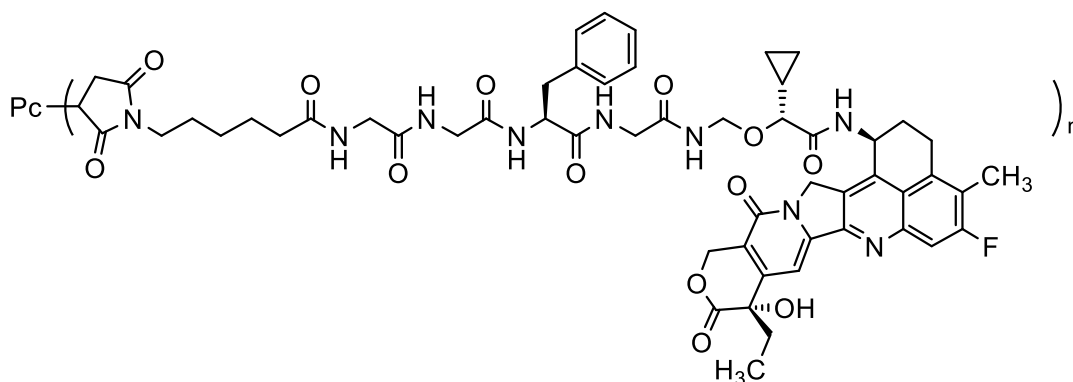
en donde:

- 10 Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde:

la región variable de cadena pesada comprende: una HCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, una HCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una HCDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y

- 15 la región variable de cadena ligera comprende: una LCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, una LCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y una LCDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. n es de 1 a 10; preferentemente, n es de 3 a 8; más preferentemente, n es de 6 a 8.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



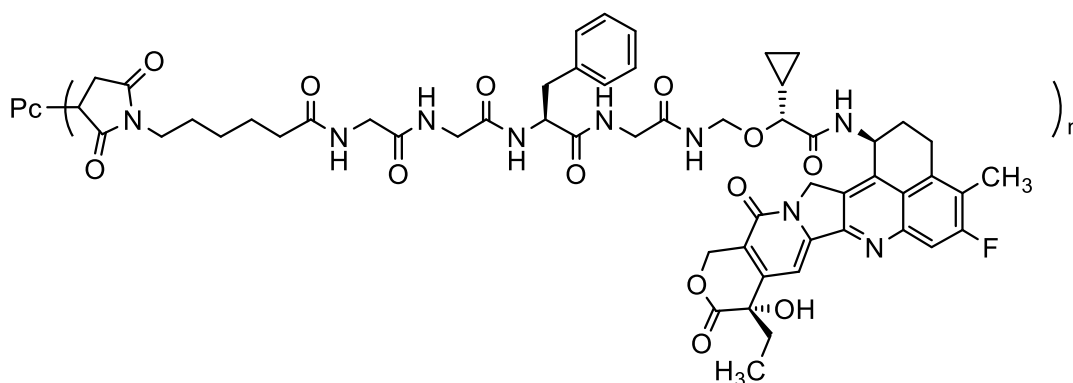
5 en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde:

la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de
10 SEQ ID NO: 55;

n es de 1 a 10; preferentemente, n es de 3 a 8; Más preferentemente, n es de 6 a 8.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



15

en donde:

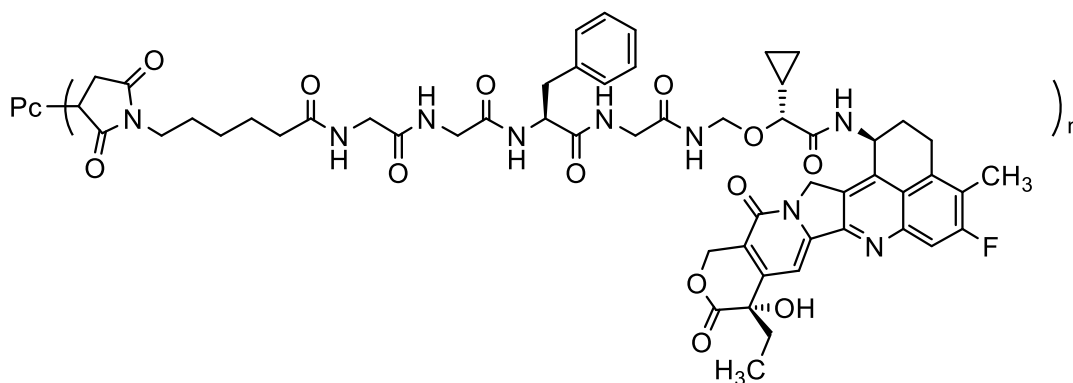
Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; o

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59;

5 n es de 1 a 10; preferentemente, n es de 3 a 8; Más preferentemente, n es de 6 a 8.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



10 en donde:

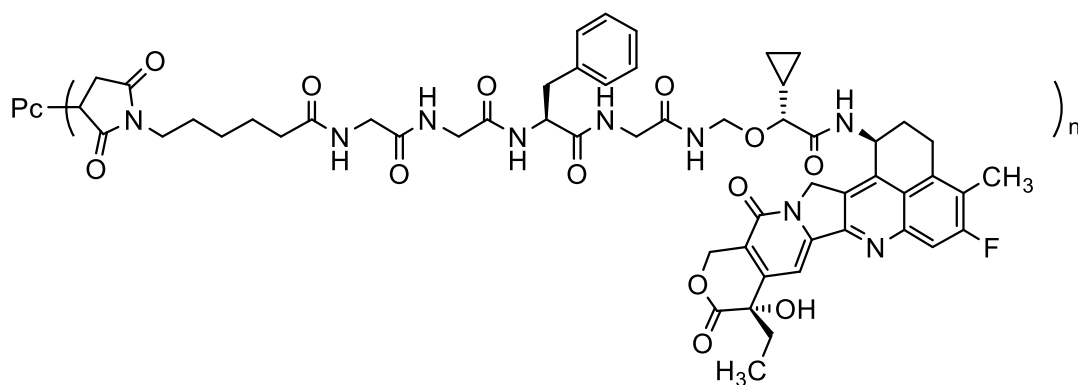
Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;

15

n es de 1 a 10; preferentemente, n es de 3 a 8; más preferentemente, n es de 6 a 8.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



en donde:

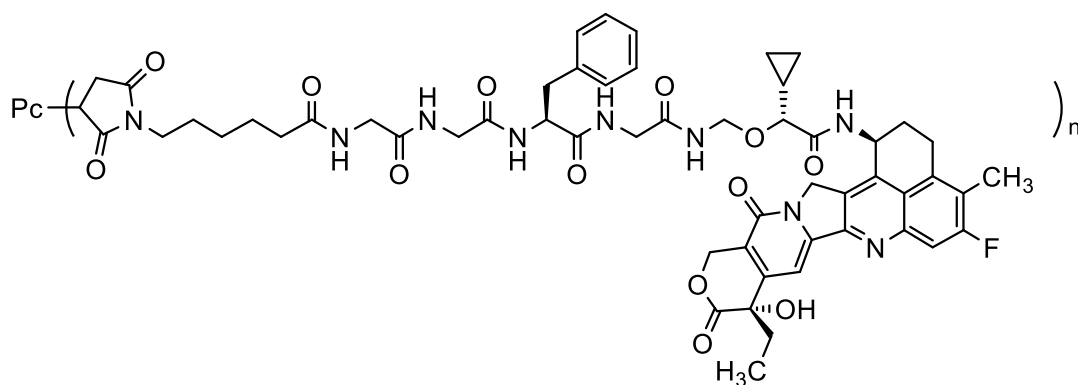
Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

- 5 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 60 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 61;

n es 4.43.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

10



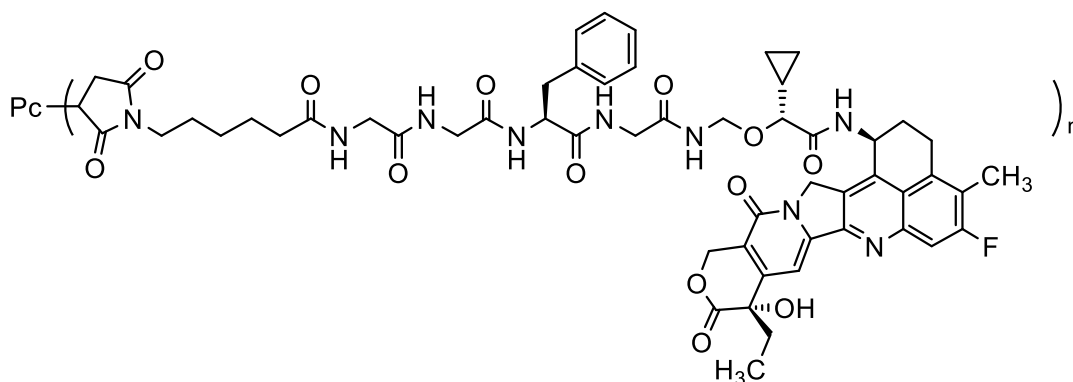
en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

- 15 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 60 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 61;

n es 7.32.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



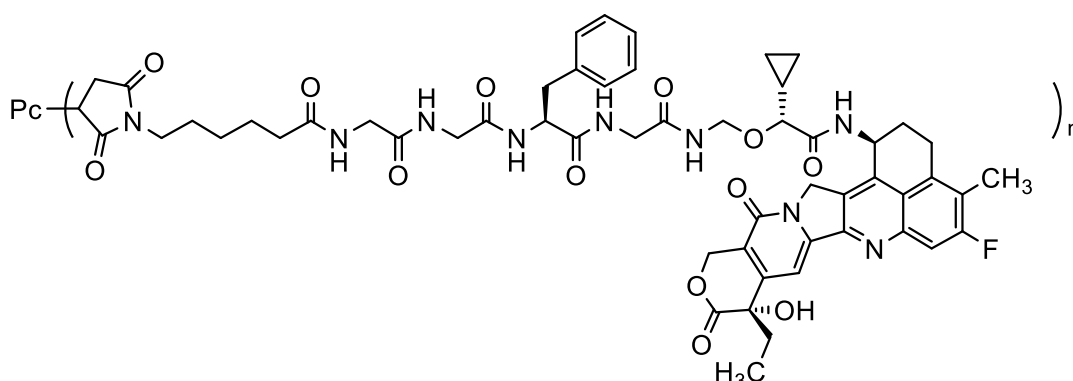
5 en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;

10 n es 6,12.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



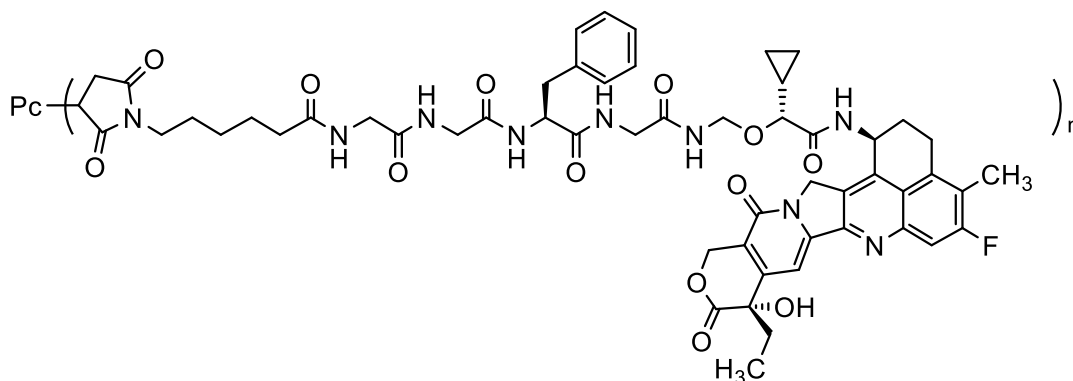
15 en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59;

n es 3.53.

En algunas modalidades, se proporciona el conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable, donde dicho conjugado tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:



5

en donde:

Pc es un anticuerpo anti-DLL3 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y la
10 cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59;

n es 7.43.

La presente invención proporciona además un método para preparar un conjugado anticuerpo-fármaco, que comprende reducir el anticuerpo anti-DLL3 según cualquiera de los puntos anteriores y luego realizar una reacción de acoplamiento con un compuesto representado
15 por (L-Y-D) para obtener el conjugado anticuerpo-fármaco según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, y uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, una dosis unitaria de la composición
20 farmacéutica comprende de 0.1 a 3000 mg o de 1 a 1000 mg del conjugado anticuerpo-fármaco mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, o de la composición farmacéutica que lo comprende, como medicamento. En algunas modalidades,
25 el conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, o la composición farmacéutica que lo comprende, se utiliza como

medicamento para el tratamiento de un cáncer o un tumor. En algunas modalidades, el conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, o la composición farmacéutica que lo comprende, se utiliza como medicamento para el tratamiento de un cáncer o tumor que expresa DLL3.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, o la composición farmacéutica mencionada, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por DLL3. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno mediado por DLL3 es un tumor o cáncer. En algunas modalidades, la enfermedad o
10 trastorno mediado por DLL3 es una enfermedad o trastorno que expresa DLL3.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los puntos anteriores, o la composición farmacéutica mencionada, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un tumor o cáncer; preferentemente, el tumor o cáncer se selecciona del grupo
15 que consiste de:

cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células grandes), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, neuroglioma, glioblastoma multiforme, neuroblastoma, cáncer del sistema nervioso central, tumor
20 neuroendocrino, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas faríngeo, carcinoma de células escamosas oral, cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides medular), mesotelioma pleural maligno, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de hígado, cáncer hepatobiliar, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer colorrectal (por
25 ejemplo, cáncer de colon y cáncer rectal), cáncer de riñón, carcinoma de células renales de células claras, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer suprarrenal, glioblastoma, cáncer de piel y melanoma; Preferentemente, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón de células pequeñas. En algunas modalidades, el tumor o cáncer expresa DLL3.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un método para tratar y/o prevenir un tumor o cáncer, el cual comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los anteriores o la composición farmacéutica mencionada anteriormente. En algunas modalidades, el tumor o cáncer expresa DLL3.

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un método para tratar o prevenir un tumor o cáncer. El método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, según cualquiera de los anteriores o la composición farmacéutica mencionada anteriormente, donde el tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste de:

cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células grandes), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, neuroglioma, glioblastoma multiforme, neuroblastoma, cáncer del sistema nervioso central, tumor neuroendocrino, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas faríngeo, carcinoma de células escamosas oral, cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer medular de tiroides), mesotelioma pleural maligno, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de hígado, cáncer hepatobiliar. Cáncer, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon y cáncer de recto), cáncer de riñón, carcinoma renal de células claras, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer suprarrenal, glioblastoma, cáncer de piel y melanoma; preferentemente, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células pequeñas.

El conjugado anticuerpo-fármaco proporcionado por la presente invención tiene buena afinidad por los antígenos de superficie celular, puede ser endocitosado eficazmente por una célula que expresa DLL3 y presenta un potente efecto inhibidor del crecimiento tumoral, además de buena seguridad.

Breve Descripción de las Figuras

Las FIGURAS 1A a 1C, muestran la unión de los anticuerpos Hu6 y Hu100 a DLL3 de diferentes especies. La FIGURA 1A muestra los resultados de FACS para la unión de los anticuerpos Hu6 y Hu100 a células H1184; la FIGURA 1B muestra los resultados de FACS para la unión de los anticuerpos Hu6 y Hu100 a las células DLL3 de cyno/CHO-s; la FIGURA 1C muestra los resultados de FACS para la unión de los anticuerpos Hu6 y Hu100 a las células DLL3 de rata/CHO-s.

La FIGURA 2, muestra los resultados experimentales para la unión competitiva de diferentes anticuerpos anti-DLL3. Los resultados muestran que Hu6 y Hu100 no compitieron con BI-764532, lo que indica que los anticuerpos Hu6 y Hu100 se unen a epítomos diferentes a los de BI-764532.

La FIGURA 3, muestra los resultados de la endocitosis de los anticuerpos Hu6 y Hu100 por las células; los resultados muestran que tanto Hu6 como Hu100 pueden ser endocitosados por las células.

Las FIGURAS 4A a 4B, muestran los resultados de la unión de ADC-1, ADC-2 y ADC-3 a las células DLL3 humanas y de mono. La FIGURA 4A muestra resultados para la unión de ADC-1, ADC-2 y ADC-3 a células DLL3 humanas; La FIGURA 4B muestra resultados para la unión de ADC-1, ADC-2 y ADC-3 a células DLL3 de mono.

Las FIGURAS 5A a 5E, muestran los efectos inhibidores del crecimiento de ADC-1, ADC-2 y ADC-3 en diferentes células. La FIGURA 5A muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de células H1184 con alta expresión de DLL3 por ADC-1, ADC-2 y ADC-3; la FIGURA 5B muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de células DMS53 con alta expresión de DLL3 por ADC-1, ADC-2 y ADC-3; la FIGURA 5C muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de células SK-MEL3 con baja expresión de DLL3 por ADC-1, ADC-2 y ADC-3; la FIGURA 5D muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de células CHO-K1 sin expresión de DLL3 por ADC-1, ADC-2 y ADC-3. La FIGURA 6 muestra los resultados de los efectos citotóxicos secundarios de ADC-1, ADC-2 y ADC-3.

La FIGURA 7, muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjerto subcutáneo de células DMS53 en ratones por ADC-1, ADC-2, ADC-4 y ADC-5.

La FIGURA 8, muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjerto subcutáneo de células DMS53 en ratones por ADC-1 y ADC-3.

La FIGURA 9, muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjerto subcutáneo de células H1184 en ratones por ADC-2, ADC-3, ADC-6 y ADC-7.

Las FIGURAS 10A a 10C, muestran los resultados de la farmacocinética de ADC-1, ADC-2 y ADC-3 en ratas. La FIGURA 10A muestra los resultados de la farmacocinética de ADC-1 en ratas. La FIGURA 10B muestra los resultados de la farmacocinética de ADC-2 en ratas; la FIGURA 10C muestra los resultados de la farmacocinética de ADC-3 en ratas.

La FIGURA 11, muestra los resultados de la farmacocinética de ADC-2 en monos cynomolgus.

Descripción Detallada de la Invención

I. Terminología

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación, se describen algunos términos técnicos y científicos. Salvo que se defina específicamente lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente

documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entienden los expertos en la materia.

Salvo que se indique lo contrario, los términos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los siguientes significados:

- 5 Las formas singulares «un», «una» y «el/la/los/las» utilizadas en la descripción y las reivindicaciones incluyen la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 10 A menos que se indique claramente lo contrario en el contexto, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras «comprender», «tener», «incluir» y similares deben interpretarse en sentido inclusivo, no exclusivo o exhaustivo.

- 15 El término «y/o» incluye dos significados: «y» y «o». Invención, la frase «A, B y/o C» abarca cada uno de los siguientes: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo). Cuando se utiliza un nombre comercial en la presente invención, se pretende incluir la formulación del producto comercial bajo dicho nombre, así como el fármaco y el componente activo del producto comercial bajo dicho nombre.

- 20 Los códigos de tres letras y de una sola letra para los aminoácidos utilizados en este documento son los descritos en J. biol. chem. 243, pág. 3558 (1968). El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos e imitadores de aminoácidos que funcionan como los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por códigos genéticos y aquellos modificados posteriormente, invención, la hidroxiprolina, el ácido γ -carboxiglutámico y la O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen una estructura química sustancialmente idéntica (es decir, un carbono α que se une al hidrógeno, carboxilo, amino y un grupo R) a la de los aminoácidos naturales, invención, la homoserina, la norleucina, el sulfóxido de metionina y el metioninametilsulfonio. Dichos análogos tienen un grupo R modificado (invención, la norleucina) o un esqueleto peptídico modificado, pero conservan una estructura química sustancialmente idéntica a la de los aminoácidos naturales. Los imitadores de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura diferente a la de los aminoácidos, pero funcionan como los aminoácidos naturales. El término "mutación de aminoácidos" incluye sustituciones (también conocidas como reemplazos), delecciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Se puede realizar cualquier combinación de sustituciones, delecciones, inserciones y modificaciones para obtener una construcción final, siempre que esta posea las propiedades deseadas, como una unión reducida al receptor Fc. Las delecciones e inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen delecciones e inserciones en el extremo amino o carboxilo de una cadena polipeptídica. Las mutaciones de aminoácidos específicas pueden ser sustituciones de
- 25
- 30
- 35

aminoácidos. En una modalidad, la mutación de aminoácidos es una sustitución no conservativa, es decir, una sustitución de un aminoácido por otro con propiedades estructurales o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución por aminoácidos no naturales o por derivados de los 20 aminoácidos nativos (invención, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina y 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos pueden generarse mediante métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida, PCR, síntesis génica, etc. Se contempla el uso de métodos para alterar los grupos de cadenas laterales de aminoácidos distintos de la ingeniería genética, como la modificación química. Se pueden usar diversos nombres para indicar la misma mutación de aminoácido. La expresión "posición + residuo de aminoácido" puede utilizarse para indicar un residuo de aminoácido en una posición específica. Invención, 366W indica que un residuo de aminoácido en la posición 366 es W. T366W indica que el residuo de aminoácido en la posición 366 ha sido sustituido de la T original a W.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, entre otras, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (invención, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos (o fragmentos de unión al antígeno, o fracciones de unión al antígeno), siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada. Un anticuerpo intacto generalmente consta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también conocida como dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también conocida como dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (región constante de la cadena ligera, CL).

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a un anticuerpo con una estructura sustancialmente similar a la de un anticuerpo nativo o cuyas cadenas pesadas presentan una región Fc. En un anticuerpo nativo intacto, la cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL), donde la VL se encuentra en el extremo amino de la cadena ligera, y la región constante de la cadena ligera comprende una cadena κ y una cadena λ . La cadena pesada comprende una región variable (VH) y regiones constantes (CH1, CH2 y CH3), donde la VH se ubica en el extremo amino de la cadena pesada y las regiones constantes en el extremo carboxilo, siendo CH₃ el más cercano a este. La cadena pesada puede ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (incluidos los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluidos los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

El término "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a un dominio en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo a un antígeno. En este contexto, la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo comprenden cada una cuatro regiones marco conservadas (FRs) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). El término "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a una región del dominio variable que contribuye principalmente a la unión al antígeno; "región marco" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de CDR. Una VH consta de tres CDRs: HCDR1, HCDR2 y HCDR3; una VL consta de tres CDR: LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el extremo amino (también conocido como extremo N) hasta el extremo carboxilo (también conocido como extremo C) en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Los límites de la secuencia de aminoácidos de las CDRs se pueden determinar mediante una variedad de esquemas bien conocidos, invención, el esquema de numeración "Kabat" (ver Kabat et al., (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), el esquema de numeración "Chothia", el esquema de numeración "ABM", el esquema de numeración "contact" (ver Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains [J]. 2001), y el esquema de numeración ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 16 de octubre de 2018; 9: 2278), y similares. Las relaciones correspondientes entre los distintos esquemas de numeración son bien conocidas por los expertos en la materia y son ejemplares, como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Relaciones entre los esquemas de numeración de CDR

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

A menos que se indique lo contrario, el esquema de numeración de Kabat se aplica a las secuencias de las regiones variables y CDRs en la presente invención.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto, que comprende una fracción de un anticuerpo intacto que se une a un

antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único, Fab monocatenario (scFab), diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

5 El término "región Fc" o "región cristalizable de fragmento" se utiliza para definir la región C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo, incluyendo las regiones Fc nativas y las regiones Fc modificadas. En algunas modalidades, la región Fc comprende dos subunidades idénticas o diferentes. En algunas modalidades, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define como la que se extiende desde el residuo de aminoácido en la posición Cys226
10 o desde Pro230 hasta su extremo carboxilo terminal. Las regiones Fc adecuadas para los anticuerpos descritos en este documento incluyen las regiones Fc de IgG1, IgG2 (IgG2A e IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas. En algunas modalidades, los límites de la región Fc también pueden modificarse, invención, eliminando la lisina C-terminal de la región Fc (residuo 447 según el esquema de numeración de la UE) o eliminando la glicina y la lisina C-terminales de la región
15 Fc (residuos 446 y 447 según el esquema de numeración de la UE). Salvo que se indique lo contrario, el esquema de numeración para la región Fc es el esquema de numeración de la UE, también conocido como índice de la UE.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo proviene de una fuente o especie particular, mientras
20 que el resto de la cadena pesada y/o ligera proviene de otra fuente o especie diferente.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano, pero presenta baja inmunogenicidad en humanos. Invención, esto puede lograrse conservando las CDR no humanas y reemplazando el resto del anticuerpo con sus homólogos humanos (es decir, las regiones constantes y la porción de la
25 región marco de las regiones variables).

Los términos "anticuerpo humano", "anticuerpo derivado de humano", "anticuerpo completamente humano" y "anticuerpo humano completo" se utilizan indistintamente y se refieren a anticuerpos en los que las regiones variable y constante son secuencias humanas. El término abarca anticuerpos derivados de genes humanos, pero que tienen, invención, secuencias que
30 reducen la posible inmunogenicidad, aumentan la afinidad, eliminan cisteínas o sitios de glicosilación que pueden causar un plegamiento no deseado, o similares. El término abarca anticuerpos producidos de forma recombinante en células no humanas (que pueden conferir una glicosilación no característica de las células humanas). También abarca anticuerpos cultivados en ratones transgénicos que comprenden locus de las cadenas pesada y ligera de

inmunoglobulina humana. El significado de anticuerpo humano excluye específicamente a los anticuerpos humanizados que comprenden residuos de unión a antígenos no humanos.

El término "afinidad" se refiere a la intensidad global de la interacción no covalente entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique lo contrario, en el presente documento, la "afinidad" de unión se refiere a una afinidad de unión interna que refleja la interacción entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede denotar generalmente mediante la constante de disociación (KD). La afinidad se puede determinar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento. En el presente documento, el término "kassoc" o "ka" se refiere a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno, mientras que el término "kdis" o "kd" se refiere a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno. El término "KD" se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación entre kd y ka (es decir, kd/ka) y se denota por la concentración molar (M). El valor de KD de un anticuerpo puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Invención, la resonancia plasmónica superficial se determina mediante un sistema de biodetección, como un sistema, o la afinidad en una solución se determina mediante la titulación en equilibrio de la solución (SET).

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo (ya sea la región Fc de secuencia nativa o la región Fc variante de secuencia de aminoácidos) y que varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen, entre otros: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento, unión al receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las secuencias de aminoácidos de las moléculas de anticuerpo que componen la población son idénticas, salvo por un pequeño número de mutaciones naturales que pueden existir. Por el contrario, las formulaciones de anticuerpos policlonales generalmente comprenden una pluralidad de anticuerpos diferentes con diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, que generalmente son específicos para diferentes epítopos. El término "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante un método específico. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o porción de una molécula que puede unirse a un agente de unión selectivo, como una proteína de unión a antígeno (incluyendo, invención, un anticuerpo). Un antígeno puede tener uno o más epítopos capaces de interactuar con diferentes proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos).

5 El término "epítipo" se refiere a una zona o región de un antígeno que puede unirse específicamente a un anticuerpo o a un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los epítopos pueden formarse a partir de cadenas contiguas de aminoácidos (epítipo lineal) o estar compuestos por aminoácidos no contiguos (epítipo conformacional), invención, por proximidad espacial debido al plegamiento del antígeno (es decir, por plegamiento terciario). La diferencia
10 entre el epítipo conformacional y el epítipo lineal radica en que, en presencia de disolventes desnaturizantes, la unión del anticuerpo al epítipo conformacional es indetectable. Un epítipo comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. El cribado de anticuerpos que se unen a epítopos específicos (es decir, aquellos que se unen a epítopos idénticos) puede realizarse mediante métodos
15 habituales en la técnica, incluyendo, invención, la gammagrafía con alanina, la inmunotransferencia (péptido blotting), el análisis de escisión de péptidos, la escisión de epítopos, la extracción de epítopos, la modificación química del antígeno (Prot. Sci. 9 (2000) 487-496) y el bloqueo cruzado.

Los términos "anticuerpo anti-DLL3" y "anticuerpo que se une a DLL3" se refieren a un
20 anticuerpo capaz de unirse a DLL3 o a uno de sus epítopos con suficiente afinidad. En una modalidad, el grado de unión del anticuerpo anti-DLL3 a una proteína no relacionada es inferior a al menos aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a DLL3, que puede medirse mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®.

Los términos "capaz de unirse específicamente", "que se une específicamente" o "que
25 se une" significan que un anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno o a uno de sus epítopos con mayor afinidad que a otros antígenos o epítopos. Generalmente, un anticuerpo se une a un antígeno o a uno de sus epítopos con una constante de disociación en equilibrio (KD) de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos (por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o menos). En algunas modalidades, la KD para la unión de un anticuerpo a un antígeno es del 10% o menos
30 (por ejemplo, 1%) de la KD para la unión del anticuerpo a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA o caseína). La KD puede determinarse mediante métodos conocidos, invención, mediante un ensayo de resonancia de plasmones de superficie BIACORE®. Sin embargo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno o a un epítipo del mismo puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con antígenos correspondientes de otras
35 especies (homólogos), como humanos o monos, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cangrejo cino), *Pan troglodytes* (chimpancé) o *Callithrix jacchus* (tití común).

El término "ácido nucleico" se utiliza indistintamente en el presente documento con el término "polinucleótido" y se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido y a un polímero del mismo, ya sea monocatenario o bicatenario. El término abarca los ácidos nucleicos que comprenden análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces modificados de la cadena principal. Los ácidos nucleicos son sintéticos, naturales y artificiales, tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de forma similar a la del nucleótido de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, entre otros, fosforotioato, fosforamidato, metilfosfonato, metilfosfonato quiral, 2-O-metil ribonucleótido y ácido peptídico-nucleico (PNA). Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de los componentes de su entorno natural. El ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico presente en una célula que generalmente comprende la molécula de ácido nucleico, pero esta se encuentra extracromosómicamente o en una posición diferente a su posición cromosómica natural. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido o una proteína de fusión se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o la proteína de fusión, incluyendo dichas moléculas en un solo vector o en vectores separados, y dichas moléculas presentes en una o más posiciones en una célula huésped. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados pueden obtenerse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con bases mixtas y/o residuos de desoxiinosina.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos en el que uno o más residuos de aminoácidos son imitaciones químicas artificiales de los aminoácidos naturales correspondientes, así como a polímeros de aminoácidos naturales y no naturales. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente sus variantes modificadas de forma conservativa.

El término "identidad" de secuencia se refiere al grado (porcentaje) de identidad de los aminoácidos/ácidos nucleicos de dos secuencias en posiciones equivalentes; cuando las dos secuencias están óptimamente alineadas, se introducen los espacios necesarios para lograr el máximo porcentaje de identidad, y cualquier sustitución conservativa no se considera parte de la identidad de secuencia. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, los alineamientos pueden realizarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los

parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación de la longitud completa de las secuencias alineadas.

El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido unido a ella. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, como un vector viral adenoasociado (AAV o AAV2), en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en la célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos con origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción y, por lo tanto, replicarse junto con el genoma del huésped. El término "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un vector que puede transformar una célula huésped y comprende una secuencia de ácido nucleico que dirige y/o controla la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas operativamente unidas a ella. Las construcciones de expresión pueden incluir, entre otras, secuencias que afectan o controlan la transcripción y la traducción, y que afectan al empalme del ARN de una región codificante operativamente unida a ella en presencia de un intrón.

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo celular huésped" se utilizan indistintamente y se refieren a células en las que se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluidas las progenies de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen células transformadas primarias y progenies derivadas de ellas, independientemente del número de pases. La progenie puede no ser exactamente igual a las células progenitoras en cuanto a contenido de ácidos nucleicos y puede contener mutaciones. Se incluyen aquí las progenies mutantes que presentan la misma función o actividad biológica que las células cribadas o seleccionadas de las células transformadas inicialmente. Las células hospedadoras incluyen células procariotas y eucariotas, incluyendo, entre otras, células de mamíferos, líneas celulares de insectos, células vegetales y células fúngicas. Ejemplos de células hospedadoras son: células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, HepG2), células A549, células 3T3 y células HEK-293, *Pichiapastoris*, *Pichia finlandica*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei*.

Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es un conjugado que se obtiene mediante la unión de un anticuerpo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) a un fármaco, ya sea directamente o mediante un ligador.

Un fármaco (abreviado como D) es cualquier sustancia con actividad biológica o detectable (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores detectables y agentes de unión) y profármacos que se metabolizan a un agente activo in vivo. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen los agentes citotóxicos, los agentes quimioterapéuticos, los agentes citostáticos y los inmunomoduladores. Los agentes quimioterapéuticos son compuestos químicos que pueden utilizarse para tratar el cáncer. Entre los agentes terapéuticos representativos se incluyen las citotoxinas, los agentes citotóxicos y los agentes citostáticos.

Los efectos citotóxicos se refieren a la delección, eliminación o muerte de células diana. Un agente citotóxico se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula. El efecto citostático se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un agente citostático se refiere a un agente que ejerce un efecto citostático sobre una célula, inhibiendo así el crecimiento o la expansión de un subconjunto particular de células.

Otros agentes terapéuticos representativos incluyen radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, inmunomoduladores, agentes antiangiogénicos, agentes antiproliferativos, agentes proapoptóticos y enzimas líticas (por ejemplo, ARNasa). Estos términos descriptivos de fármacos no son mutuamente excluyentes y, por lo tanto, uno o más de los términos anteriores pueden usarse para describir un agente terapéutico. Por ejemplo, el radioisótopo seleccionado también es una citotoxina. Los agentes terapéuticos pueden prepararse como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Generalmente, los conjugados que tienen un radioisótopo como fármaco se denominan radioinmunoconjugados, y aquellos que tienen un agente quimioterapéutico como fármaco, quimioinmunoconjugados.

Entre los ejemplos de agentes citotóxicos se incluyen, entre otros, exatecán, antraciclinas, auristatinas, CC-1065, dolastatina, duocarmicina, enediinas, geldanamicina, maitansina, puromicina, taxanos, alcaloides de la vinca, SN-38, tubulisina, hemiasterlina, eribulina, trabectedina, lurbinectedina y sus estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados. También se pueden utilizar agentes quimioterapéuticos, toxinas vegetales, otras proteínas bioactivas, enzimas (por ejemplo, ADEPT), radioisótopos y fotosensibilizadores (por ejemplo, para terapia fotodinámica).

El término «marcador», en este documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo «marcado». El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar un cambio químico detectable en un compuesto o composición del sustrato. Los marcadores radioisotópicos incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. El marcador también puede ser una entidad no detectable, como una toxina.

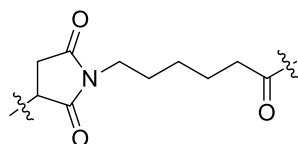
El término "unidad de enlace" o "enlazador" se refiere a un fragmento o enlace estructural químico que está unido a un anticuerpo en un extremo y a un fármaco en el otro, y también puede estar unido a otros enlazadores antes del anticuerpo o fármaco. La unión de un ligador a un anticuerpo puede lograrse de diversas maneras, como mediante lisinas superficiales, acoplamiento reductor a carbohidratos oxidados, residuos de cisteína liberados mediante enlaces disulfuro intercatenarios reductores, residuos de cisteína reactivos diseñados en sitios específicos y etiquetas que contienen glutaminas donantes de acilo, o una glutamina endógena reactiva mediante ingeniería de polipéptidos en presencia de transglutaminasa y una amina. Se conocen diversos sistemas de enlace de ADC en la técnica, incluyendo enlaces basados en hidrazona, disulfuro y péptidos.

El enlazador puede comprender uno o más elementos de enlace. Algunos ejemplos de elementos de enlace incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropionilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC", también denominado en este documento "MCC") y N-succinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato ("SIAB").

El enlazador puede seleccionarse del grupo que consiste en los siguientes elementos o una combinación de los mismos: un extensor, un espaciador y una unidad de aminoácido. El enlazador puede sintetizarse mediante métodos conocidos en la técnica, como los descritos en el documento US20050238649A1. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que favorece la liberación de fármacos en las células. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores lábiles a ácidos (por ejemplo, hidrazonas), enlazadores sensibles a proteasas (por ejemplo, sensibles a peptidasas), enlazadores fotolábiles, enlazadores dimetil o enlazadores que contienen disulfuro (Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131(1992); Patente Estadounidense No. 5.208.020).

Los elementos enlazadores incluyen, entre otros:

MC = 6-maleimidocaproilo, cuya estructura se muestra a continuación:



Val-Cit o "vc" = valina-citrulina (un dipéptido ejemplar en un enlazador escindible por proteasas),

citrulina = ácido 2-amino-5-ureidopentanoico,

PAB = p-aminobenciloxicarbonilo (un ejemplo de elementos enlazadores “autoinmolativos”),

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (donde el enlace peptídico enlazador se ha modificado para evitar su escisión por la catepsina B),

5 MC(PEG)6-OH = maleimidocaproil-polietilenglicol (que se puede unir a la cisteína del anticuerpo),

SPP = 4-(2-piridiltio)valerato de N-succinimidilo,

SPDP = N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)propionato,

SMCC = succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, e

10 IT = iminotiolano.

“L-D” es la fracción enlazadora-fármaco resultante de la unión del fármaco (D) al enlazador (L).

La “carga de fármaco”, también conocida como relación fármaco-anticuerpo (DAR), se refiere al número promedio de fármacos acoplados a cada anticuerpo en un ADC. Puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 fármacos conjugados con cada anticuerpo, y en ciertas modalidades, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 fármacos conjugados con cada anticuerpo, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 1-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 5-6, 5-7, 5-8 y 6-8 fármacos conjugados con cada anticuerpo. Las fórmulas generales de ADC de la presente invención incluyen un conjunto de conjugados anticuerpo-fármaco dentro de un cierto rango, como se describió anteriormente. En las modalidades de la presente invención, la carga de fármaco puede representarse por n y es un decimal o un entero. La carga del fármaco puede determinarse mediante métodos convencionales como la espectroscopia UV/visible, la espectrometría de masas, los ensayos ELISA, la HIC y la RP-HPLC.

25 En una modalidad de la presente invención, el fármaco se conjuga con el grupo reactivo (por ejemplo, sulfhidrilo) del anticuerpo mediante un ligador.

La carga del fármaco de un ADC puede controlarse mediante los siguientes métodos no limitativos, entre ellos:

- (1) controlar la relación molar entre un reactivo de ligadura y un anticuerpo monoclonal,
- 30 (2) controlar el tiempo y la temperatura de reacción, y
- (3) seleccionar diferentes reactivos de reacción.

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada con entre 1 y 20 átomos de carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) (es decir, alquilo C₁₋₂₀). El alquilo es preferentemente un grupo alquilo con entre 1 y 12 átomos de carbono (es decir, alquilo C₁₋₁₂), y más preferentemente un grupo alquilo con entre 1 y 6 átomos de carbono (es decir, alquilo C₁₋₆). Los ejemplos no limitantes incluyen: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, n-heptilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 2,3-dimetilpentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, n-octilo, 2,3-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 3,3-dimetilhexilo, 4,4-dimetilhexilo, 2-etilhexilo, 3-etilhexilo, 4-etilhexilo, 2-metil-2-etilpentilo, 2-metil-3-etilpentilo, n-nonilo, 2-metil-2-etilhexilo, 2-metil-3-etilhexilo, 2,2-dietilpentilo, n-decilo, 3,3-dietilhexilo, 2,2-dietilhexilo, sus diversos isómeros de cadena ramificada y similares. El alquilo puede estar sustituido o no, y cuando lo está, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: un átomo de D, halógeno, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

El término "alquilenio" se refiere a un grupo alquilo divalente, donde el alquilo es como se definió anteriormente. Tiene de 1 a 20 átomos de carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) (es decir, alquilenio C₁₋₂₀). El alquilenio es preferentemente un grupo alquilenio de 1 a 12 átomos de carbono (es decir, alquilenio C₁₋₁₂), más preferentemente un grupo alquilenio de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, alquilenio C₁₋₆). Ejemplos no limitativos incluyen: -CH₂-, -CH(CH₃)-, -C(CH₃)₂-, -CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH₂CH(CH₃)-, -CH₂C(CH₃)₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, y similares. El alquilenio puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más átomos de deuterio, halógeno, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

El término "alquenilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono en la molécula, donde el grupo alquilo es como se definió anteriormente y tiene de 2 a 12 átomos de carbono (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) (es decir, alquenilo C₂₋₁₂). El alquenilo es preferentemente un grupo alquenilo con de 2 a 6 átomos de carbono (es decir, alquenilo C₂₋₆). Ejemplos no limitativos incluyen: etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, etc. El alquenilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando lo está,

puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: un átomo de deuterio, alcoxi, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxil, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclico, arilo y heteroarilo.

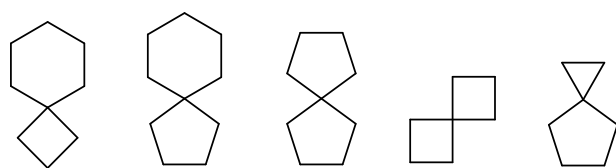
- 5 El término "alquinilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono en la molécula, donde el grupo alquilo es como se definió anteriormente y tiene de 2 a 12 átomos de carbono (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) (es decir, alquinilo C_{2-12}). El alquinilo es preferentemente un grupo alquinilo con 2 a 6 átomos de carbono (es decir, alquinilo C_{2-6}). Ejemplos no limitativos incluyen: etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, etc.
- 10 El alquinilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más átomos de deuterio, alcoxi, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxil, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclico, arilo y heteroarilo.

- 15 El término "alcoxi" se refiere a -O-(alquilo), donde el alquilo es como se definió anteriormente. Ejemplos no limitativos incluyen: metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares. El alcoxi puede estar sustituido o no, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: un átomo de deuterio, halógeno, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxil, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclico, arilo y heteroarilo.
- 20 El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico de carbono saturado o parcialmente insaturado (es decir, cicloalquilo monocíclico) o a un sistema policíclico (es decir, cicloalquilo policíclico) que tiene de 3 a 20 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo (es decir, cicloalquilo de 3 a 20 miembros). El cicloalquilo es preferentemente un grupo cicloalquilo con de 3 a 12 átomos en el anillo (es decir, cicloalquilo de 3 a 12 miembros), más preferentemente un grupo cicloalquilo con de 3 a 8 átomos en el anillo (es decir, cicloalquilo de 3 a 8 miembros), y aún más preferentemente un grupo cicloalquilo con de 3 a 6 átomos en el anillo (es decir, cicloalquilo de 3 a 6 miembros, cicloalquilo C_{3-6}).
- 25

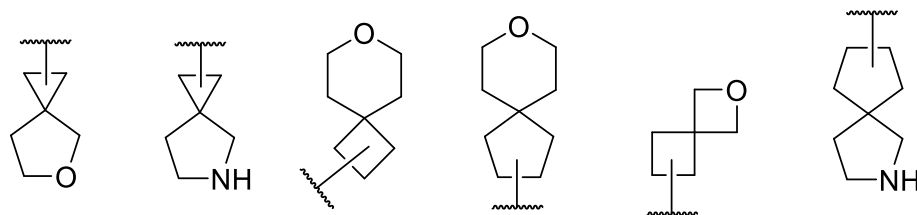
- Ejemplos no limitativos de cicloalquilo monocíclico incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, cicloheptatrienilo, ciclooctilo y similares.
- 30

- El cicloalquilo policíclico incluye: espirocicloalquilo, cicloalquilo fusionado y cicloalquilo puenteado. El término "espirocicloalquilo" se refiere a un sistema policíclico en el que un átomo de carbono (denominado átomo espiro) se comparte entre anillos, que pueden contener en los anillos uno o más dobles enlaces o pueden contener en los anillos uno o más heteroátomos
- 35

seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-), siempre que esté contenido al menos un anillo completamente de carbono y el punto de unión esté en el anillo completamente de carbono; y que tiene de 5 a 20 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo (es decir, un espirocicloalquilo de 5 a 20 miembros). El espirocicloalquilo es preferentemente un grupo espirocicloalquilo con de 6 a 14 átomos en el anillo (es decir, un espirocicloalquilo de 6 a 14 miembros), y más preferentemente un grupo espirocicloalquilo con de 7 a 10 átomos en el anillo (es decir, un espirocicloalquilo de 7 a 10 miembros). El espirocicloalquilo incluye monoespirocicloalquilo y poliespirocicloalquilo (por ejemplo, biespirocicloalquilo), preferentemente monoespirocicloalquilo o biespirocicloalquilo, y más preferentemente de 3 miembros/4 miembros, de 3 miembros/5 miembros, de 3 miembros/6 miembros, de 4 miembros/4 miembros, de 4 miembros/5 miembros, de 4 miembros/6 miembros, de 5 miembros/3 miembros, de 5 miembros/4 miembros, de 5 miembros/5 miembros, de 5 miembros/6 miembros, de 5 miembros/7 miembros, de 6 miembros/3 miembros, de 6 miembros/4 miembros, de 6 miembros/5 miembros, de 6 miembros/6 miembros, de 6 miembros/7 miembros, de 7 miembros/5 miembros, o monoespirocicloalquilo de 7/6 miembros. Ejemplos no limitativos:



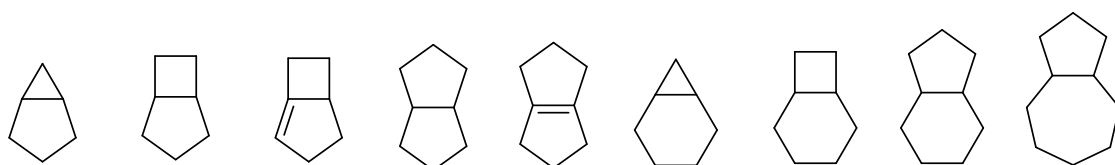
, en donde el punto de unión puede estar en cualquier posición;



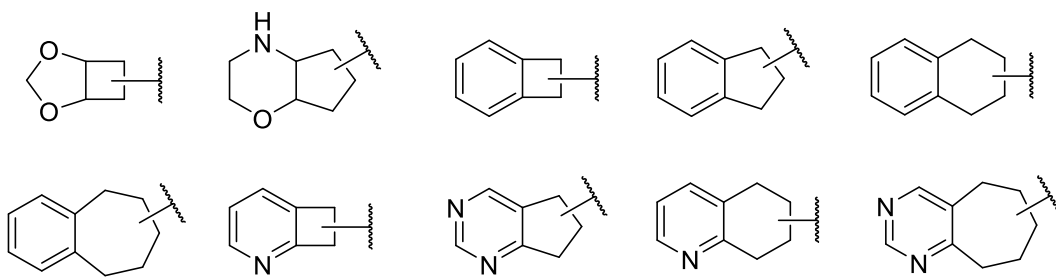
y similares.

El término "cicloalquilo fusionado" se refiere a un sistema policíclico en el que dos átomos de carbono adyacentes se comparten entre anillos. Este sistema se forma mediante la fusión de un grupo cicloalquilo monocíclico con uno o más grupos cicloalquilo monocíclicos, o mediante la fusión de un grupo cicloalquilo monocíclico con uno o más grupos heterociclilo, arilo o heteroarilo, donde el punto de unión se encuentra en un grupo cicloalquilo monocíclico. El sistema puede contener uno o más dobles enlaces y tiene de 5 a 20 átomos de carbono en el anillo (es decir, cicloalquilo fusionado de 5 a 20 miembros). El cicloalquilo fusionado es preferentemente un grupo cicloalquilo fusionado que tiene de 6 a 14 átomos de anillo (es decir,

cicloalquilo fusionado de 6 a 14 miembros), y más preferentemente un grupo cicloalquilo fusionado que tiene de 7 a 10 átomos de anillo (es decir, cicloalquilo fusionado de 7 a 10 miembros). El cicloalquilo fusionado incluye cicloalquilo fusionado bicíclico y cicloalquilo fusionado policíclico (por ejemplo, cicloalquilo fusionado tricíclico y cicloalquilo fusionado tetracíclico), preferentemente cicloalquilo fusionado bicíclico o cicloalquilo fusionado tricíclico, y más preferentemente cicloalquilo fusionado de 3 miembros/4 miembros, 3 miembros/5 miembros, 3 miembros/6 miembros, 4 miembros/4 miembros, 4 miembros/5 miembros, 4 miembros/6 miembros, 5 miembros/3 miembros, 5 miembros/4 miembros, 5 miembros/5 miembros, 5 miembros/6 miembros, 5 miembros/7 miembros, 6 miembros/3 miembros, 6 miembros/4 miembros, 6 miembros/5 miembros, 6 miembros/6 miembros, 6 miembros/7 miembros, Cicloalquilo bicíclico fusionado de 7/5 miembros o de 7/6 miembros. Ejemplos no limitativos incluyen:

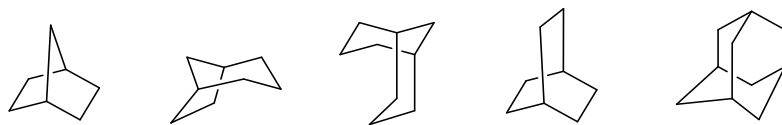


donde el punto de unión puede estar en cualquier posición;



15 y similares.

El término "cicloalquilo puenteado" se refiere a un sistema policíclico compuesto exclusivamente por carbonos en el que dos átomos de carbono no directamente conectados se comparten entre anillos, que pueden contener uno o más dobles enlaces y tienen de 5 a 20 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos de carbono (es decir, cicloalquilo puenteado de 5 a 20 miembros). El cicloalquilo puenteado es preferentemente un grupo cicloalquilo puenteado de 6 a 14 átomos de carbono (es decir, un cicloalquilo puenteado de 6 a 14 miembros), y más preferentemente un grupo cicloalquilo puenteado de 7 a 10 átomos de carbono (es decir, un cicloalquilo puenteado de 7 a 10 miembros). El cicloalquilo puenteado incluye cicloalquilos bicíclicos y policíclicos (por ejemplo, cicloalquilos tricíclicos y tetracíclicos), preferentemente cicloalquilos bicíclicos o tricíclicos. Ejemplos no limitativos incluyen:



,en donde el punto de unión puede estar en cualquier posición.

El cicloalquilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible, y el sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de un átomo de D, halógeno, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxil, hidroxialquilo, oxo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

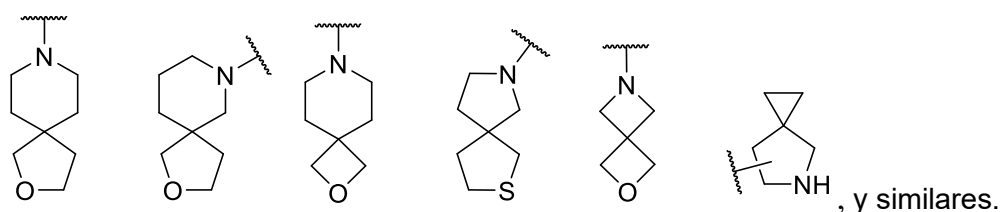
El término "heterociclilo" se refiere a un sistema heterocíclico monocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, heterociclilo monocíclico) o heterocíclico policíclico (es decir, heterociclilo policíclico), que contiene en el anillo o los anillos al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-) y tiene de 3 a 20 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo. (es decir, heterociclilo de 3 a 20 miembros). El heterociclilo es preferentemente un grupo heterociclilo con 3 a 12 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo de 3 a 12 miembros), preferentemente un grupo heterociclilo con 3 a 8 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo de 3 a 8 miembros), más preferentemente un grupo heterociclilo con 3 a 6 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo de 3 a 6 miembros), y aún más preferentemente un grupo heterociclilo con 5 o 6 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo de 5 o 6 miembros).

Ejemplos no limitativos de heterociclilo monocíclico incluyen: pirrolidinilo, tetrahidropirranilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, homopiperazinilo y similares.

El heterociclilo policíclico incluye espiroheterociclilo, heterociclilo fusionado y heterociclilo puenteado.

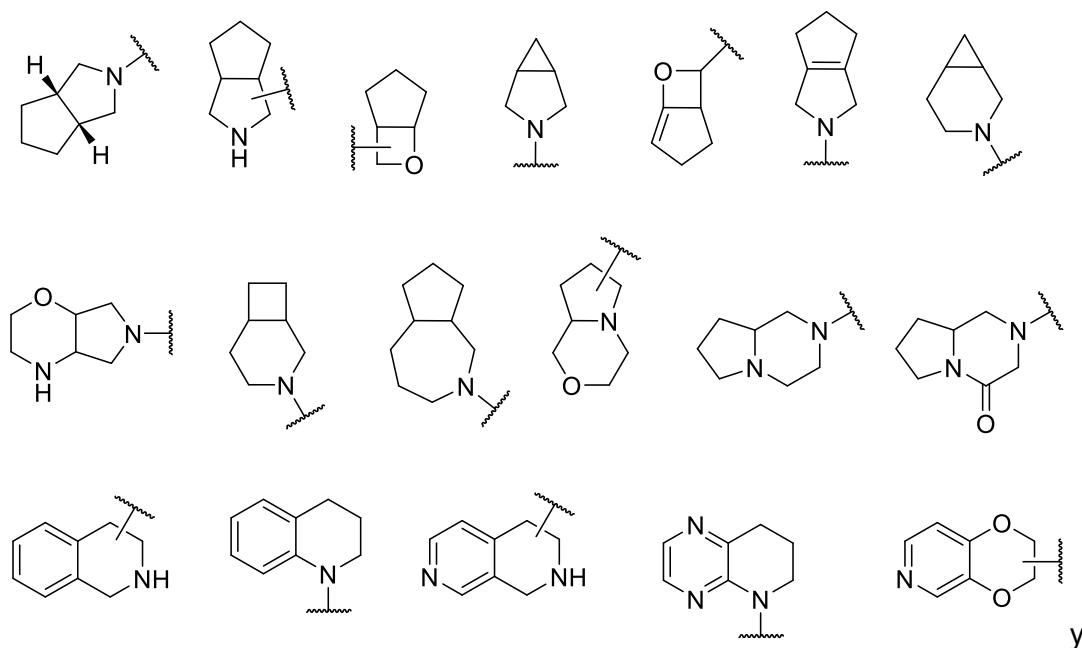
El término "espiroheterociclilo" se refiere a un sistema heterocíclico policíclico en el que un átomo (denominado átomo espiro) se comparte entre anillos, que pueden contener en los anillos uno o más dobles enlaces y contienen en los anillos al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-), siempre que esté contenido al menos un grupo heterociclilo monocíclico y el punto de unión esté en el grupo heterociclilo monocíclico; y que tiene de 5 a 20 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo (es decir, espiroheterociclilo de 5 a 20 miembros). El espiroheterociclilo es preferentemente un grupo espiroheterociclilo con de 6 a 14 átomos en el anillo (es decir, espiroheterociclilo de 6 a 14 miembros), más preferentemente un grupo espiroheterociclilo con de 7 a 10 átomos en el anillo (es decir, espiroheterociclilo de 7 a 10 miembros). El espiroheterociclilo incluye monoespiroheterociclilo y poliespiroheterociclilo (por ejemplo, biespiroheterociclilo), preferentemente monoespiroheterociclilo o biespiroheterociclilo, y más preferentemente de 3 miembros/4 miembros, 3 miembros/5 miembros, 3 miembros/6 miembros, 4 miembros/4 miembros, 4 miembros/5 miembros, 4 miembros/6 miembros, 5 miembros/3 miembros, 5 miembros/4 miembros, 5 miembros/5 miembros, 5 miembros/6 miembros, 5 miembros/7 miembros, 6 miembros/3 miembros, 6 miembros/4 miembros, 6 miembros/5 miembros, 6 miembros/6 miembros, 6 miembros/7 miembros, monoespiroheterociclilo de 7 miembros/5 miembros o de 7 miembros/6 miembros. Ejemplos no limitativos incluyen:



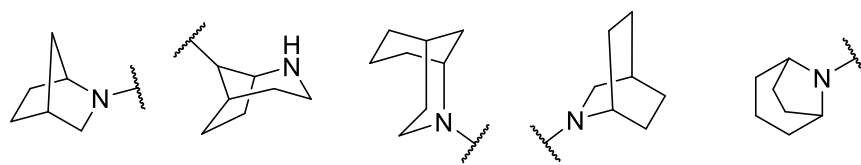
El término "heterociclilo fusionado" se refiere a un sistema heterocíclico policíclico en el que dos átomos adyacentes se comparten entre anillos, que puede contener uno o más dobles enlaces y al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o una sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-). que se forma fusionando un grupo heterociclilo monocíclico con uno o más grupos heterociclilo monocíclicos, o fusionando un grupo heterociclilo monocíclico con uno o más de un grupo cicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, donde el punto de unión está en un grupo heterociclilo monocíclico; y que tiene de 5 a 20 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo (es decir, heterociclilo fusionado de 5 a 20 miembros). El heterociclilo fusionado es preferentemente un grupo heterociclilo fusionado que tiene de 6 a 14 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo fusionado de 6 a 14 miembros), y más preferentemente un grupo heterociclilo fusionado que tiene de 7 a 10 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo fusionado de 7 a 10 miembros). El heterociclilo fusionado incluye heterociclilo fusionado bicíclico y policíclico (por ejemplo, heterociclilo fusionado tricíclico y heterociclilo fusionado tetracíclico), preferentemente heterociclilo fusionado bicíclico o heterociclilo fusionado tricíclico, más preferentemente de 3 miembros/4 miembros, de 3 miembros/5 miembros, de 3 miembros/6 miembros, de 4 miembros/4 miembros, de 4

miembros/5 miembros, de 4 miembros/6 miembros, de 5 miembros/3 miembros, de 5 miembros/4 miembros, de 5 miembros/5 miembros, de 5 miembros/6 miembros, de 5 miembros/7 miembros, de 6 miembros/3 miembros, de 6 miembros/4 miembros, de 6 miembros/5 miembros, de 6 miembros/6 miembros, de 6 miembros/7 miembros, Heterociclilo bicíclico fusionado de 7/5 miembros o de 7/6 miembros. Ejemplos no limitativos incluyen:



similares.

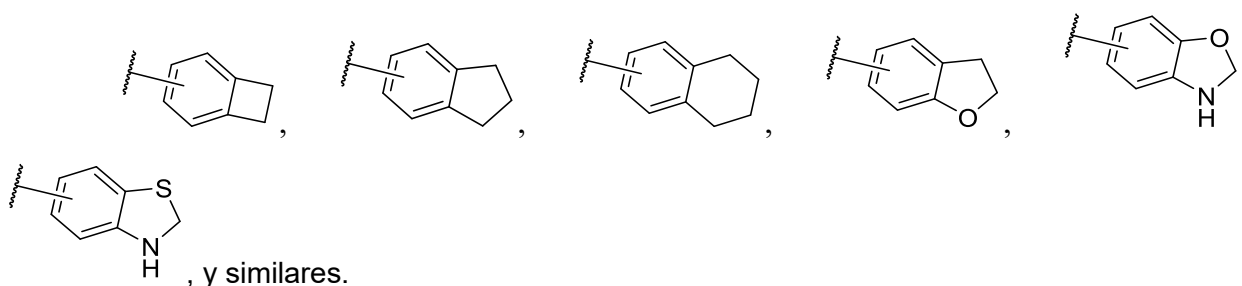
El término "heterociclilo puenteado" se refiere a un sistema heterocíclico policíclico en el que dos átomos que no están conectados directamente se comparten entre anillos, que pueden contener en los anillos uno o más dobles enlaces y contienen en los anillos al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-); y que tiene de 5 a 20 (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) átomos en el anillo (es decir, heterociclilo con puente de 5 a 20 miembros). El heterociclilo con puente es preferentemente un grupo heterociclilo con puente de 6 a 14 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo con puente de 6 a 14 miembros), y más preferentemente un grupo heterociclilo con puente de 7 a 10 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo con puente de 7 a 10 miembros). Según el número de anillos constituyentes, el heterociclilo con puente puede dividirse en heterociclilo con puente bicíclico y heterociclilo con puente policíclico (por ejemplo, heterociclilo con puente tricíclico y heterociclilo con puente tetracíclico), preferentemente heterociclilo con puente bicíclico o heterociclilo con puente tricíclico. Ejemplos no limitativos incluyen:



y similares.

El heterociclilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: un átomo de deuterio, halógeno, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, oxo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo. El término "arilo" se refiere a un anillo aromático monocíclico de carbono (es decir, arilo monocíclico) o a un sistema anular aromático policíclico (es decir, arilo policíclico) con un sistema de electrones π conjugados, que tiene de 6 a 14 (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14) átomos en el anillo (es decir, arilo de 6 a 14 miembros).

El arilo es preferentemente un grupo arilo con de 6 a 10 átomos en el anillo (es decir, arilo de 6 a 10 miembros). Un ejemplo de arilo monocíclico es fenilo. Ejemplos no limitativos de arilo policíclico incluyen: naftilo, antrilo, fenantrilo y similares. El arilo policíclico también incluye aquellos formados mediante la fusión de un grupo fenilo con uno o más grupos heterociclilo o cicloalquilo, o mediante la fusión de un grupo naftilo con uno o más grupos heterociclilo o cicloalquilo, donde el punto de unión se encuentra en el grupo fenilo o naftilo, y en estas circunstancias, el número de átomos en el anillo sigue representando el número de átomos en el anillo del sistema de anillo aromático policíclico; ejemplos no limitativos incluyen:



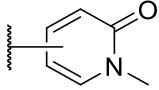
, y similares.

El arilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible, y el sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más átomos de D, halógeno, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquiloxi, heterocicliloxi, hidroxilo, hidroxialquilo, oxo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

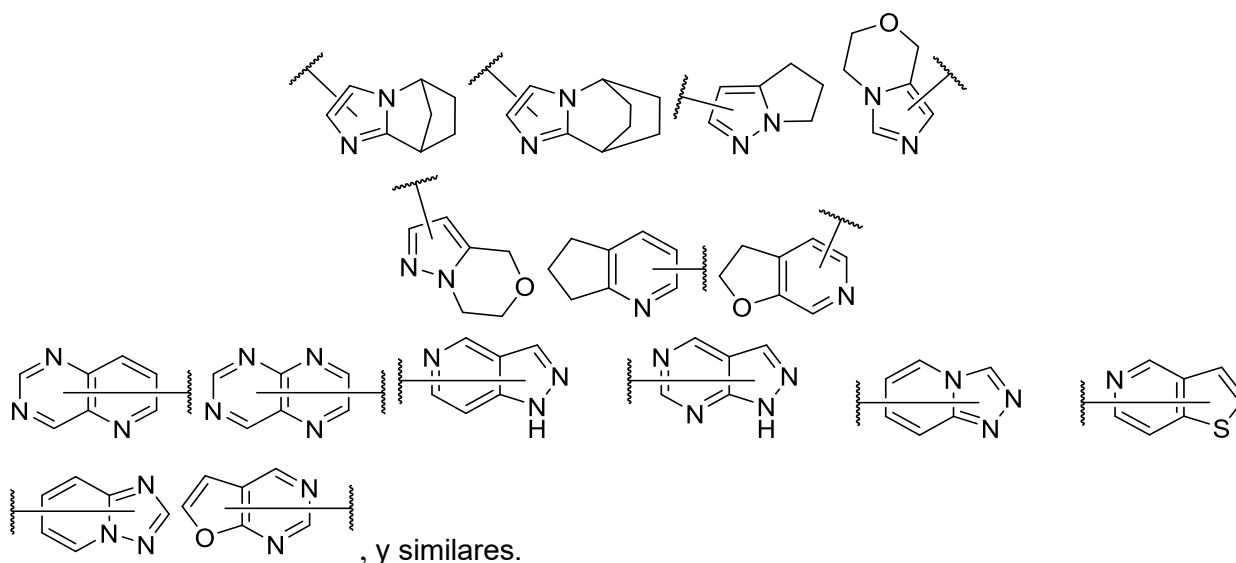
El término "heteroarilo" se refiere a un anillo heteroaromático monocíclico (es decir, heteroarilo monocíclico) o a un sistema de anillo heteroaromático policíclico (es decir, heteroarilo

policíclico) con un sistema de electrones π conjugados, que contiene en el anillo o anillos al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (el nitrógeno puede oxidarse opcionalmente para formar un óxido de nitrógeno; el azufre puede sustituirse opcionalmente con oxo para formar un sulfóxido o una sulfona, excluyendo -O-O-, -O-S- o -S-S-) y tiene de 5 a 14 átomos en el anillo (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14) (es decir, heteroarilo de 5 a 14 miembros). El heteroarilo es preferentemente un grupo heteroarilo con 5 a 10 átomos en el anillo (es decir, heteroarilo de 5 a 10 miembros), más preferentemente un grupo heteroarilo con 5 o 6 átomos en el anillo (es decir, heteroarilo de 5 o 6 miembros).

- 10 Ejemplos no limitativos de heteroarilo monocíclico incluyen: furanilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, furazanilo, pirrolilo, N-alquilpirrolilo, piridinilo, pirimidinilo, piridonilo, N-alquilpiridinona

(por ejemplo, , pirazinilo, piridazinilo y similares. Ejemplos no limitativos de heteroarilo policíclico incluyen: indolilo, indazolilo, quinolilo, isoquinolilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, benzimidazolilo, benzotienilo, quinazolinilo, benzotiazolilo, carbazolilo, etc. El heteroarilo policíclico también incluye aquellos formados por la fusión de un grupo heteroarilo monocíclico con uno o más grupos arilo, donde el punto de unión se encuentra en un anillo aromático, y en estas circunstancias, el número de átomos del anillo sigue representando el número de átomos del anillo en el sistema de anillo heteroaromático policíclico. Ejemplos no limitativos incluyen:

20



- 25 El heteroarilo puede estar sustituido o no sustituido, y cuando está sustituido, puede estarlo en cualquier punto de unión accesible. El sustituyente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: un átomo de deuterio, halógeno, alquilo,

alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, cicloalquilo, heterociclilo, hidroxi, hidroxialquilo, ciano, amino, nitro, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo.

El término "grupo protector de amino" se refiere a un grupo fácilmente eliminable que se introduce en un grupo amino para que este permanezca inalterado cuando otras partes de la molécula participan en reacciones. Ejemplos no limitativos incluyen: (trimetilsilil)etoximetilo, tetrahidropiraniolo, terc-butiloxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Cbz), fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), aliloxycarbonilo (Alloc), trimetilsililetoxycarbonilo (Teoc), metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, ftaloílo (Pht), p-toluenosulfonilo (Tos), trifluoroacetilo (Tfa), tritilo (Trt), 2,4-dimetoxibencilo (DMB), acetilo, bencilo, alilo, p-metoxibencilo y similares.

El término "grupo protector de hidroxi" se refiere a un grupo fácilmente eliminable que se introduce en un grupo hidroxi para bloquearlo o protegerlo, de modo que las reacciones tengan lugar en otros grupos funcionales del compuesto. Ejemplos no limitativos incluyen: trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), terc-butildimetilsililo (TBS), terc-butildifenilsililo (TBDPS), metilo, terc-butilo, alilo, bencilo, metoximetilo (MOM), etoxietilo, 2-tetrahidropiraniolo (THP), formilo, acetilo, benzoílo, p-nitrobenzoílo y similares.

El término "cicloalquilo" se refiere a cicloalquil-O-, donde el cicloalquilo es como se definió anteriormente.

El término "heterociclilo" se refiere a heterociclil-O-, donde el heterociclilo es como se definió anteriormente.

El término "arilo" se refiere a aril-O-, donde el arilo es como se definió anteriormente.

El término "heteroarilo" se refiere a heteroaril-O-, donde el heteroarilo es como se definió anteriormente. El término "alquiltio" se refiere a alquilo-S-, donde el alquilo es el definido anteriormente.

El término "haloalquilo" se refiere a alquilo sustituido con uno o más halógenos, donde el alquilo es el definido anteriormente.

El término "haloalcoxi" se refiere a un grupo alcoxi sustituido con uno o más halógenos, donde el grupo alcoxi es el definido anteriormente.

El término "alquilo deuterado" se refiere a un alquilo sustituido con uno o más átomos de deuterio, donde el alquilo es el definido anteriormente.

El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más grupos hidroxi, donde el alquilo es el definido anteriormente.

El término "metilideno" se refiere a $=CH_2$.

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

El término "hidroxi" se refiere a -OH.

El término "sulfhidrilo" se refiere a -SH.

El término "amino" se refiere a -NH₂.

5 El término "ciano" se refiere a -CN.

El término "nitro" se refiere a -NO₂.

El término "oxo" se refiere a "=O".

El término "carbonilo" se refiere a C=O.

El término "carboxilo" se refiere a -C(O)OH.

10 El término "grupo carboxilato" se refiere a -C(O)O(alquilo), -C(O)O(cicloalquilo), (alquilo)C(O)O- o (cicloalquilo)C(O)O-, donde alquilo y cicloalquilo se definen como se indicó anteriormente.

En fórmulas químicas, la abreviatura "Me" se refiere a metilo.

En fórmulas químicas, la abreviatura "Ph" se refiere a fenilo.

15 El término "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

El término "EtOAc" se refiere a acetato de etilo.

El término "MeOH" se refiere a metanol.

El término "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida. El término "DIPEA" se refiere a diisopropiletilamina.

20 El término "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético.

El término "MeCN" se refiere a acetonitrilo.

El término "DMA" se refiere a N,N-dimetilacetamida.

El término "Et₂O" se refiere a éter dietílico.

El término "DCE" se refiere a 1,2-dicloroetano.

25 El término "DIPEA" se refiere a N,N-diisopropiletilamina.

El término "NBS" se refiere a N-bromosuccinimida.

El término "NIS" se refiere a N-yodosuccinimida.

El término "Cbz-Cl" se refiere a cloroformiato de bencilo.

El término "Pd₂(dba)₃" se refiere a tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0).

El término "Dppf" se refiere a 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno. El término "HATU" se refiere al óxido de 2-(7-benzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametilurea hexafluorofosfato.

5 El término "KHMDS" se refiere a la hexametildisilamida de potasio.

El término "LiHMDS" se refiere a la bis(trimetilsilil)amida de litio.

El término "MeLi" se refiere al metil-litio.

El término "n-BuLi" se refiere al n-butillitio.

El término "NaBH(OAc)₃" se refiere al triacetoxiborohidruro de sodio.

10 El término "DCM" se refiere al diclorometano.

El término "DMAP" se refiere a la 4-dimetilaminopiridina.

El término "DMBOH" se refiere al alcohol 2,4-dimetoxibencílico.

El término "EDCI" se refiere a la 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida. El término «MTBE» se refiere al metil terc-butil éter.

15 El término «DMF» se refiere a la N,N-dimetilformamida.

El término «DMTMM» se refiere al clorhidrato de 4-(4,6-dimetoxitriazin-2-il)-4-metilmorfolina.

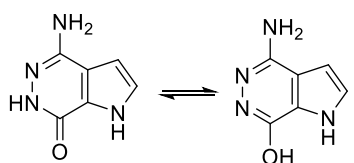
El término «EtOAc» se refiere al acetato de etilo.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas estereoisómeras específicas. El término "estereoisómero" se refiere a isómeros estructuralmente idénticos, pero que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio. Incluye isómeros cis y trans (o Z y E), isómeros (-) y (+), enantiómeros (R) y (S), diastereómeros, isómeros (D) y (L), tautómeros, atropisómeros, confórmeros y mezclas de los mismos (por ejemplo, mezclas de racematos y diastereómeros). Puede haber átomos asimétricos adicionales en los sustituyentes de los compuestos de la presente invención. Todos estos estereoisómeros y sus mezclas se incluyen en el alcance de la presente invención. Los isómeros (-) y (+), los enantiómeros (R) y (S), y los isómeros (D) y (L) ópticamente activos pueden prepararse mediante síntesis quiral, reactivos quirales u otras técnicas convencionales. Un isómero de un compuesto de la presente invención puede prepararse mediante síntesis asimétrica o con un auxiliar quiral. O bien, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico (por ejemplo, amino) o ácido (por ejemplo, carboxilo), se forma una sal diastereomérica con un ácido o base ópticamente activo adecuado,

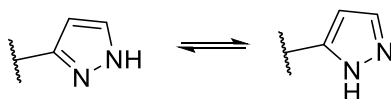
seguida de la resolución diastereomérica mediante métodos convencionales conocidos en la técnica para obtener el isómero puro. Además, la separación de enantiómeros y diastereómeros se realiza generalmente mediante cromatografía.

En la estructura química del compuesto de la presente invención, un enlace " / " representa una configuración no especificada; es decir, si existen isómeros quirales en la estructura química, el enlace " / " puede ser " / " o " \ ", o incluir ambas configuraciones, " / " y " \ ".

Los compuestos de la presente invención pueden existir en diferentes formas tautoméricas, y todas estas formas están incluidas dentro del alcance de la presente invención. El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a un isómero estructural que existe en equilibrio y se transforma fácilmente de una forma isomérica a otra. Incluye todos los tautómeros posibles; es decir, está presente en forma de un solo isómero o en forma de una mezcla de tautómeros en cualquier proporción. Ejemplos no limitativos incluyen: ceto-enol, imina-enamina, lactama-lactima y similares. La lactama-lactima en equilibrio es la siguiente:



Por ejemplo, se entiende que la referencia a pirazolilo incluye cualquiera de las dos estructuras siguientes o una mezcla de las dos tautómeros:



Todas las formas tautoméricas entran dentro del alcance de la presente invención, y la nomenclatura de los compuestos no excluye ningún tautómero.

Los compuestos de la presente invención incluyen todos los derivados isotópicos adecuados de los mismos. El término "derivado isotópico" se refiere a un compuesto en el que al menos un átomo se sustituye por otro con el mismo número atómico, pero diferente masa atómica. Entre los isótopos que pueden incorporarse a los compuestos de la presente invención se incluyen los isótopos estables y radiactivos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro, bromo, yodo, etc., como ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio, T), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I y ^{131}I ; se prefiere el deuterio.

En comparación con los fármacos no deuterados, los fármacos deuterados presentan las ventajas de reducir los efectos tóxicos y secundarios, aumentar la estabilidad farmacológica,

mejorar la eficacia, prolongar la vida media biológica, etc. Todas las variaciones isotópicas del compuesto de la presente invención, sean radiactivas o no, se incluyen en el alcance de la presente invención. Cada átomo de hidrógeno disponible conectado a un átomo de carbono puede reemplazarse independientemente por un átomo de deuterio. La sustitución de deuterio puede ser parcial o completa, y la sustitución parcial de deuterio se refiere a la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por al menos un átomo de deuterio.

Cuando una posición se asigna específicamente como "deuterio" o "D", debe interpretarse como una abundancia de deuterio al menos 1000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (que es del 0.015%) (es decir, una incorporación de deuterio de al menos el 15%). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 1000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 15% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 1000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 15% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 2000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 30% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 3000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 45% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 3340 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 50.1% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 3500 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 52.5% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 4000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 60% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 4500 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 67.5% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 5000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 75% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 5500 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 82,5% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 6000 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 90% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de

deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 6333.3 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 95% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 6466,7 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 97% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 6600 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 99% de incorporación de deuterio). En algunas modalidades, la abundancia de deuterio de cada uno de los átomos de deuterio asignados es al menos 6633.3 veces mayor que la abundancia natural de deuterio (es decir, al menos un 99.5% de incorporación de deuterio).

"Sustitución" o "sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno del grupo, preferentemente de 1 a 6, y más preferentemente de 1 a 3, están sustituidos independientemente con un número correspondiente de sustituyentes. Los expertos en la materia pueden determinar (experimental o teóricamente) sustituciones posibles o imposibles sin esfuerzo. Por ejemplo, puede ser inestable cuando un grupo amino o hidroxilo con hidrógeno libre se une a un átomo de carbono con un enlace insaturado (por ejemplo, una olefina).

La presente invención también incluye diversas formas deuteradas de conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula (Pc-L-Y-D). Cada átomo de hidrógeno disponible unido a un átomo de carbono puede ser reemplazado independientemente por un átomo de deuterio. Los expertos en la materia pueden sintetizar formas deuteradas de conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula (Pc-L-Y-D) consultando la bibliografía pertinente. Se pueden utilizar materiales de partida deuterados disponibles comercialmente para preparar formas deuteradas de conjugados anticuerpo-fármaco de fórmula (Pc-L-Y-D), o bien pueden sintetizarse mediante técnicas convencionales con reactivos deuterados, incluyendo, entre otros, borano deuterado, borano tri-deuterado en tetrahidrofurano, hidruro de litio y aluminio deuterado, yodoetano deuterado, yodometano deuterado y similares.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir, pero no necesariamente. Esto incluye tanto un caso en el que el evento o circunstancia ocurre como un caso en el que no. Por ejemplo, «alquilo opcionalmente sustituido con halógeno o ciano» incluye un caso en el que el alquilo está sustituido con halógeno o ciano y un caso en el que el alquilo no está sustituido con halógeno o ciano.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla que contiene uno o más de los compuestos o sus sales o profármacos fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables descritos en este documento, y otros componentes químicos, así como otros componentes como vehículos y excipientes fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables. La composición

farmacéutica está diseñada para promover la administración al organismo y facilitar la absorción del principio activo para que pueda ejercer su bioactividad.

La composición farmacéutica puede presentarse en forma de solución acuosa inyectable estéril. Los vehículos o disolventes aceptables incluyen agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. La formulación inyectable estéril puede ser una microemulsión de aceite en agua inyectable estéril en la que el principio activo se disuelve en la fase oleosa. Por ejemplo, el principio activo se disuelve en una mezcla de aceite de soja y lecitina. A continuación, la solución oleosa se añade a una mezcla de agua y glicerol y se trata para formar una microemulsión. La inyección o microemulsión puede inyectarse localmente en el torrente sanguíneo de un sujeto en grandes cantidades. Alternativamente, la solución y la microemulsión se administran de forma que se mantenga una concentración circulante constante del compuesto de la presente invención. Para mantener dicha concentración constante, se puede utilizar un dispositivo de administración intravenosa continua. Un ejemplo de dicho dispositivo es la bomba de inyección intravenosa Deltec CADD-PLUS. TM. 5400.

La composición farmacéutica puede presentarse en forma de suspensión acuosa u oleosa inyectable estéril para administración intramuscular y subcutánea. La suspensión puede prepararse según el estado de la técnica utilizando los dispersantes, humectantes y agentes de suspensión adecuados descritos anteriormente. La formulación inyectable estéril también puede ser una inyección o suspensión estéril preparada en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución preparada en 1,3-butanodiol. Además, se puede utilizar convencionalmente un aceite fijo estéril como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede utilizar cualquier mezcla de aceite fijo, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, también se pueden utilizar ácidos grasos como el ácido oleico en la preparación de inyecciones.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención que es segura y eficaz cuando se administra a un sujeto y posee la actividad biológica requerida. A modo de ejemplo, el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención comprende al menos un grupo amino y, por lo tanto, puede formar una sal con un ácido. Ejemplos no limitativos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen: clorhidrato, bromhidrato, yodato, sulfato, bisulfato, citrato, acetato, succinato, ascorbato, oxalato, nitrato, sorbato, hidrofosfato, dihidrofosfato, salicilato, hidrocitrato, tartrato, maleato, fumarato, formiato, benzoato, mesilato, etanosulfonato, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica que es diferente del ingrediente activo y no es tóxico para el sujeto.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, tampones, estabilizantes o conservantes.

El término "excipiente" se refiere a una adición, además del ingrediente activo, a una formulación farmacéutica. También puede denominarse material auxiliar. Por ejemplo, aglutinantes, rellenos, desintegrantes y lubricantes en comprimidos. La matriz en preparaciones semisólidas de ungüentos y cremas; los conservantes, antioxidantes, correctores, fragancias, cosolventes, emulsionantes, solubilizantes, reguladores de presión osmótica, colorantes y similares en formulaciones líquidas pueden denominarse excipientes.

El término "diluyente", también conocido como relleno, se utiliza principalmente para aumentar el peso y el volumen del comprimido. La adición del diluyente no solo garantiza un volumen determinado, sino que también reduce la desviación de la dosis de los ingredientes principales y mejora la moldeabilidad por compresión del fármaco, entre otras funciones. Cuando el fármaco en comprimido contiene componentes oleosos, se añade necesariamente un absorbente para absorberlos y mantener un estado seco, facilitando así la preparación del comprimido. Algunos ejemplos incluyen almidón, lactosa, sales inorgánicas de calcio, celulosa microcristalina, etc.

El término "sujeto" o "individuo" incluye tanto a seres humanos como a animales. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (por ejemplo, mamíferos y no mamíferos), como primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos), ovejas, perros, vacas, aves, anfibios y reptiles. Salvo indicación contraria, los términos «paciente» y «sujeto» se utilizan indistintamente en el presente documento. En el presente documento, el término «mono cinomolgo» o «cinomolgo» se refiere a *Macaca fascicularis*. En ciertas modalidades, el individuo o sujeto es un ser humano.

«Administrar» o «dar», cuando se aplica a animales, seres humanos, sujetos de experimentación, células, tejidos, órganos o fluidos biológicos, se refiere al contacto de un fármaco exógeno, un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o una composición con los animales, seres humanos, sujetos, células, tejidos, órganos o fluidos biológicos.

El término «muestra» se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos aislados de un sujeto, así como a los fluidos, células o tejidos presentes en un sujeto. Ejemplos de muestras son fluidos biológicos (como sangre, suero, fluidos serosos, plasma, linfa, orina, saliva, fluidos quísticos, lágrimas, excreciones, esputo, secreciones mucosas de tejido y órganos secretores, secreciones vaginales, ascitis, fluidos de la pleura, el pericardio, el peritoneo, la cavidad abdominal y otras cavidades corporales, fluidos recogidos del lavado bronquial, fluidos sinoviales, soluciones líquidas en contacto con un sujeto o una fuente biológica, por ejemplo, medios de cultivo de células y órganos (incluidos los medios de cultivo acondicionados para

células u órganos), fluidos de lavado, etc.), muestras de biopsia de tejido, punciones con aguja fina, tejidos extirpados quirúrgicamente, cultivos de órganos o cultivos celulares.

«Tratamiento» o «tratar» (y sus variantes gramaticales) se refiere a la intervención clínica que intenta alterar la evolución patológica del individuo tratado, la cual puede realizarse con fines profilácticos o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, aliviar o reducir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o aliviar la enfermedad y revertir o mejorar el pronóstico. En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención se utiliza para retrasar el desarrollo o ralentizar la progresión de una enfermedad.

"Cantidad eficaz" es generalmente una cantidad suficiente para reducir la gravedad o la frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas o las causas subyacentes, prevenir la aparición de síntomas o sus causas subyacentes, o mejorar el daño causado por o asociado con una enfermedad. En algunas modalidades, la cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz. Una «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad suficiente para tratar una enfermedad o un síntoma, en particular una enfermedad o un síntoma asociado a ella, o para prevenir, dificultar, retrasar o revertir la progresión de la enfermedad o cualquier otro síntoma indeseable asociado a ella. Una «cantidad profilácticamente eficaz» es una cantidad que, al administrarse a un sujeto, tendrá un efecto profiláctico predeterminado, por ejemplo, prevenir o retrasar la aparición (o recurrencia) de la enfermedad, o reducir la probabilidad de aparición (o recurrencia) de la enfermedad o los síntomas asociados. Un efecto terapéutico o profiláctico completo no se produce necesariamente tras la administración de una dosis, sino que puede producirse tras la administración de varias dosis. Por lo tanto, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz puede administrarse en una o más dosis. La "cantidad terapéuticamente eficaz" y la "cantidad profilácticamente eficaz" pueden variar en función de diversos factores, como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, así como de la capacidad de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos para obtener la respuesta deseada en el individuo. Algunos indicadores ejemplares de la eficacia de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, la mejora de la salud del paciente.

II. Descripción de Modalidades Específicas

A. Estructura del anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco

En ciertas modalidades, el anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo de longitud completa.

En ciertas modalidades, el anticuerpo proporcionado en este documento es un fragmento de anticuerpo.

En una modalidad, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', Fab'-SH o $F(ab')_2$, en particular un fragmento Fab. "Fab" es un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1. Un "fragmento Fab" puede producirse mediante la escisión de un anticuerpo con papaína. "Fab" comprende VL, CL, VH y CH1, y también comprende la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula $F(ab')_2$. "Fab'-SH" es un fragmento Fab' en el que los residuos de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo sulfhidrilo libre. " $F(ab')_2$ " es un fragmento bivalente compuesto por dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno. El fragmento comprende una VH y una VL unidas en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, estos se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena, lo que resulta en dos sitios de unión al antígeno. Los dos antígenos pueden ser idénticos o diferentes.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab monocatenario. Un "fragmento Fab monocatenario" o "scFab" es un polipéptido compuesto por VH, CH1, VL, CL y un enlazador. Los dominios y el enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en dirección del extremo N al C: a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b) VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1, o d) VL-CH1-enlazador-VH-CL. En una modalidad, el enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. En otra modalidad, el enlazador es un polipéptido de entre 32 y 50 aminoácidos. El fragmento Fab monocatenario se estabiliza mediante el enlace disulfuro natural entre CL y CH1. Además, estas moléculas Fab monocatenarias pueden estabilizarse aún más mediante la generación de enlaces disulfuro intercatenarios mediante la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, posición 44 en la región variable de la cadena pesada y posición 100 en la región variable de la cadena ligera, según la numeración de Kabat).

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un fragmento variable monocatenario (scFv). «scFv» es una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo con una región variable de la cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo con una región variable de la cadena pesada, donde las regiones variables de la cadena ligera y pesada están unidas contiguamente por un enlace polipeptídico corto y flexible y pueden expresarse como un polipéptido monocatenario, y donde el scFv conserva la especificidad del anticuerpo

intacto del que deriva. A menos que se indique específicamente, un scFv puede tener regiones variables VL y VH en cualquier orden. Por ejemplo, en relación con los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fd compuesto por los dominios VH y CH1.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fv compuesto por los dominios VH y VL de un único brazo del anticuerpo.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un dsFv obtenido mediante la unión de polipéptidos en los que un residuo de aminoácido de cada uno de los dominios VH y VL se sustituye por un residuo de cisteína mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. Los residuos de aminoácidos sustituidos por residuos de cisteína pueden seleccionarse según métodos conocidos (Protein Engineering, 7:697 (1994)) basándose en la predicción de la estructura tridimensional del anticuerpo.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio único. Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo.

En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de dominio (dAb); véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.248.516. Los anticuerpos de dominio (dAb) son dominios de unión funcionales de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de los anticuerpos humanos. Los dAb tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o son menos de una décima parte del tamaño de un anticuerpo intacto. Los dAb se expresan bien en diversos hospedadores, incluyendo sistemas celulares bacterianos, de levaduras y de mamíferos. Además, los dAb son muy estables y conservan su actividad incluso después de ser sometidos a condiciones adversas, como la liofilización o la desnaturalización por calor. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; y 6,172.197; Solicitu de Patente Estadounidense No. 2004/0110941; Patente europea 0368684; Patente Estadounidense No. 6,696,245; WO04/058821; WO04/003019 y WO03/002609.

En ciertas modalidades, el anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo quimérico. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo doméstico o primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que la clase o subclase se ha cambiado con respecto a la clase o subclase del anticuerpo original.

En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Normalmente, los anticuerpos no humanos se humanizan para reducir su inmunogenicidad en humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende una o más regiones variables donde las CDR o porciones de estas se derivan de un anticuerpo no humano y las FR o porciones de estas se derivan de un anticuerpo humano. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado también comprenderá una porción de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado pueden reemplazarse con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo que proporciona secuencias de CDR).

Los anticuerpos humanizados y los métodos para su producción se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen con más detalle, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU.* 86:10029-10033 (1989); Patentes Estadounidenses Nos. 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de la región determinante de especificidad [SDR]); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "resurfacing"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la "reorganización de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer* 83:252-260 (2000) (que describe el método de «selección guiada» para la reorganización de FR).

Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen, entre otras: regiones marco seleccionadas mediante el método de «mejor ajuste» (véase, por ejemplo, Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco humanas maduras (somáticamente mutadas) o regiones marco de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco obtenidas mediante el cribado de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

B. Modificación del anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco

En ciertas modalidades, se incluyen variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en el conjugado de anticuerpo proporcionado en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante

síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para obtener la construcción final, siempre que esta posea las características deseadas, por ejemplo, la unión al antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En ciertas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos con una o más sustituciones de aminoácidos. Las posiciones de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen CDR y FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 2, bajo el título "Sustitución preferida". Los cambios más sustanciales se proporcionan en la Tabla 2, bajo el título "Sustitución ejemplar", y se describen con más detalle a continuación en relación con las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos se analizan para determinar la actividad deseada, por ejemplo, retención/mejora de la unión al antígeno, reducción de la inmunogenicidad o mejora de la ADCC o la CDC.

Tabla 2

Residuo original	Substitución ejemplar	Substitución preferida
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp,Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucine	Leu
Leu(L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucine	Leu

Según las propiedades comunes de las cadenas laterales, los aminoácidos se pueden agrupar de la siguiente manera:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

5 (2) neutros e hidrófilos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que afectan la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

10 Las sustituciones no conservativas implican la sustitución de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

En ciertas modalidades, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más CDRs, siempre que dichos cambios no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse cambios conservativos (por ejemplo, sustituciones conservativas como las que se describen en este documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las CDRs. Dichos cambios pueden ocurrir, por ejemplo, fuera de los residuos que contactan con el antígeno en las CDR. En ciertas modalidades de las secuencias variantes de VH y VL proporcionadas anteriormente, cada CDR permanece inalterada o contiene no más de 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos.

20 Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que puedan utilizarse como dianas de mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica un residuo o grupo de residuos (por ejemplo, residuos cargados como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza con un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, Ala o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Además, se puede estudiar la estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Estos residuos de contacto y los residuos vecinos pueden seleccionarse o eliminarse como candidatos a sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si

25

30 contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales con una longitud que varía desde 1 residuo hasta polipéptidos de 100 o más residuos, e inserciones intrasecuenciales de uno o más residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N- o C-terminal del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

b) Modificaciones de la región Fc

En ciertas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo descrito en este documento.

En algunas modalidades, una o más modificaciones de aminoácidos pueden reducir la unión de Fc a un receptor Fc, por ejemplo, su unión a un receptor Fcγ, y reducir o eliminar la función efectora. En algunas modalidades, la región Fc diseñada muestra una reducción de no menos del 50%, 80%, 90% o 95% en la afinidad de unión por un receptor Fc en comparación con la región Fc nativa. En algunas modalidades, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIB o FcγRIIIa. En algunas modalidades, la región Fc diseñada también tiene una afinidad de unión reducida por un complemento (por ejemplo, C1q) en comparación con la región Fc nativa. En algunas modalidades, la región Fc diseñada exhibe una afinidad de unión mejorada por el receptor Fc neonatal (FcRn) en comparación con la región Fc nativa. Por ejemplo, se introducen mutaciones como M252Y/S254T/T256E en la región Fc. En algunas modalidades, la región Fc modificada presenta funciones efectoras reducidas, que pueden incluir, entre otras, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (CDA), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por las células presentadoras de antígenos, unión a linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, monocitos, polimorfonucleares, apoptosis inducida por señalización directa, maduración de células dendríticas y cebado de linfocitos T. En la región Fc de IgG₁, las sustituciones de aminoácidos en posiciones como 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 pueden reducir las funciones efectoras. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG₁ humana, y los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son A, numerados según el índice EU. En la región Fc de IgG₄, las sustituciones de aminoácidos en posiciones como la 228 pueden reducir las funciones efectoras.

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 (según el esquema de numeración EU) de la región Fc.

En ciertas modalidades, el dominio Fc del anticuerpo de la presente invención comprende mutaciones de "perillas en huecos". La "perillas en huecos" es una estrategia de diseño para la ingeniería de homodímeros de cadena pesada de anticuerpos para su heterodimerización (por ejemplo, para la producción eficaz de anticuerpos biespecíficos, multiespecíficos o monobrazos). Generalmente, esta tecnología implica la introducción de una protuberancia ("perilla") en la interfaz de un primer polipéptido (como un primer dominio CH3 en una primera cadena pesada de anticuerpo) y una cavidad correspondiente ("hueco") en la interfaz de un segundo polipéptido (como un segundo dominio CH3 en una segunda cadena pesada de anticuerpo), de modo que la protuberancia pueda posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímeros e impedir la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido (como un primer dominio CH3 en una primera cadena pesada de anticuerpo) con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, arginina, fenilalanina, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido (como un segundo dominio CH3 en una segunda cadena pesada de anticuerpo) reemplazando grandes cadenas laterales de aminoácidos con cadenas laterales más pequeñas (por ejemplo, alanina, serina, valina o treonina). Las protuberancias y cavidades pueden generarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos (por ejemplo, mediante mutagénesis específica de sitio) o mediante síntesis de péptidos. En algunas modalidades, una modificación de perilla comprende la sustitución del aminoácido T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y una modificación de agujero comprende las sustituciones de los aminoácidos T366S, L368A e Y407V en la otra subunidad del dominio Fc. En algunas modalidades, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de perilla comprende además la sustitución del aminoácido S354C, y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de agujero comprende además la sustitución del aminoácido Y349C. La introducción de los dos residuos de cisteína da lugar a la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, lo que estabiliza aún más el dímero (Carter, J. Immunol. Methods 248:7-15 (2001)). Las combinaciones ejemplares de mutaciones de "perillas en agujeros" incluyen, entre otras, las que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Monómero Fc 1	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S
Monómero Fc 2	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

Los detalles sobre la tecnología de "perillas en agujeros" se describen, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,731,168; la Patente Estadounidense No 7,695,936; los documentos WO 2009/089004; US 2009/0182127; Marvin y Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658; Kontermann, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26:1-9; Ridgway et al., *Prot Eng* 9:617-621 (1996); y Carter, *J Immunol Meth* 248:7-15 (2001). El extremo C-terminal de la región Fc puede ser un extremo C-terminal intacto que termina en los residuos de aminoácidos PGK o un extremo C-terminal truncado, por ejemplo, un extremo C-terminal truncado en el que se han eliminado uno o dos residuos de aminoácidos C-terminales. En un aspecto preferido, el extremo C-terminal de la cadena pesada es un extremo C-terminal truncado que termina en PG.

Por lo tanto, en algunas modalidades, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 y/o residuos G446 + K447 eliminados. En algunas modalidades, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 y/o residuos G446 + K447 eliminados. En algunas modalidades, una composición de anticuerpos intactos comprende una mezcla de anticuerpos con y sin residuos K447 y/o residuos G446 + K447.

C. Método de recombinación

Los anticuerpos anti-DLL3 pueden producirse mediante métodos recombinantes. Para estos métodos, se proporcionan uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos.

En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo mencionado. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar, cada uno independientemente, cualquiera de las cadenas polipeptídicas mencionadas. En otro aspecto, la presente invención proporciona uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dichos ácidos nucleicos. En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende dichos ácidos nucleicos. En una modalidad, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-DLL3, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se indicó anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión y, opcionalmente, recolectar el anticuerpo de la célula huésped (o del medio de cultivo celular huésped).

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dichos ácidos nucleicos pueden aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales, producirse mediante métodos de recombinación u obtenerse mediante síntesis química.

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar un vector que codifica el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en este documento. Por ejemplo, puede producirse en bacterias, especialmente cuando no se requieren la glicosilación ni las funciones efectoras de Fc. Tras la expresión, puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y purificarse posteriormente.

D. Ensayos

El conjugado anticuerpo-fármaco proporcionado en este documento puede identificarse, analizarse o caracterizarse por sus características fisicoquímicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. En un aspecto, la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención se analiza, por ejemplo, mediante métodos conocidos como ELISA, Western blot, etc.

E. Método de tratamiento y vía de administración

Cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco mencionados anteriormente, o sus sales farmacéuticamente aceptables proporcionadas en este documento, puede utilizarse para el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco DLL3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento. En algunas modalidades, la presente invención proporciona el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco DLL3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor o cáncer. En algunas modalidades, el tumor o cáncer incluye, entre otros, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células grandes), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, neuroglioma, glioblastoma multiforme, neuroblastoma, cáncer del sistema nervioso central, tumor neuroendocrino, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas faríngeo, carcinoma de células escamosas oral, cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer medular de tiroides), mesotelioma pleural maligno, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de hígado, cáncer hepatobiliar, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon y cáncer de recto), cáncer de riñón, carcinoma de células renales de células claras, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, Cáncer suprarrenal, glioblastoma, cáncer de piel y melanoma; preferentemente, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células pequeñas.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona el uso de un conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con DLL3.

5 En una de dichas modalidades, el uso comprende además la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes terapéuticos adicionales).

10 En otro aspecto más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo, para cualquiera de los usos farmacéuticos o métodos de tratamiento mencionados anteriormente. En una modalidad, la composición farmacéutica comprende cualquiera de los polipéptidos o conjugados farmacológicos proporcionados en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, la composición farmacéutica también comprende al menos un agente terapéutico adicional.

15 El conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención puede utilizarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, el conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional. El conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención puede administrarse por cualquier vía adecuada, incluyendo la administración
20 parenteral, intrapulmonar e intranasal, así como, si se requiere para el tratamiento local, la administración intralesional. La infusión parenteral incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración puede realizarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyección, como la intravenosa o la subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es a corto o largo plazo. Se contemplan diversas
25 pautas de administración, incluyendo, entre otras, la administración única o múltiples administraciones en diferentes momentos, la administración en bolo y la infusión en pulsos.

El conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención se formulará, administrará y aplicará de conformidad con las Buenas Prácticas Médicas. Los factores considerados en este contexto incluyen el trastorno específico a
30 tratar, el mamífero específico a tratar, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, la vía de administración, el momento de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo anti-DLL3 o su conjugado farmacológico puede formularse junto con uno o más agentes adicionales. La cantidad efectiva de dichos agentes adicionales depende de la cantidad presente en la composición farmacéutica, el tipo de
35 trastorno o tratamiento, y otros factores. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y

vías de administración que se describen en este documento, o en aproximadamente entre el 1% y el 99% de las dosis descritas en este documento, o en otras dosis, y por cualquier vía que se determine empírica o clínicamente como apropiada.

5 Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada del conjugado anticuerpo-fármaco anti-DLL3 o de su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención (cuando se utiliza solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de molécula terapéutica, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la molécula terapéutica se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta a la molécula
10 terapéutica, y el criterio del médico tratante. La molécula terapéutica se administra adecuadamente a un paciente en uno o varios tratamientos.

F. Producto

15 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un producto (por ejemplo, una caja de medicamentos) que comprende materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos mencionados. El producto comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre el envase o asociado al mismo. Entre los envases adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución intravenosa y similares. El envase puede estar hecho de diversos materiales, como vidrio o plástico.

20 El envase contiene el conjugado anticuerpo anti-DLL3-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, de la presente invención, solo o en combinación con otra composición. El envase puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa con tapón). Al menos un agente activo de la composición es el conjugado anticuerpo anti-DLL3-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable, de la presente
25 invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la afección seleccionada.

Además, el producto puede comprender: (a) un primer envase que contiene el conjugado anticuerpo anti-DLL3-fármaco o su sal farmacéuticamente aceptable; y (b) un segundo envase que contiene una composición, donde la composición comprende un agente
30 citotóxico adicional o un agente terapéutico. Como alternativa o adicionalmente, el producto puede incluir un segundo (o tercer) recipiente con un tampón farmacéuticamente aceptable. Desde una perspectiva comercial y de usuario, puede incluir además otros materiales según sea necesario, como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

La presente invención se describe con más detalle a continuación con referencia a ejemplos, pero estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Los métodos experimentales sin condiciones específicas indicadas en los ejemplos o ejemplos de prueba de la presente invención se llevaron a cabo generalmente en condiciones convencionales o en las condiciones recomendadas por el fabricante de las materias primas o productos comerciales. Los reactivos sin orígenes específicos indicados son reactivos convencionales disponibles comercialmente.

I. Preparación de Anticuerpos

Ejemplo 1: Preparación de Antígenos DLL3, Proteínas para la Detección y Cepas Celulares Transfectadas de Forma Estable

Se transfectaron células CHO-s de ovario de hámster chino (Invitrogen, R80007) con genes DLL3 de diferentes especies y genes DLL1 y DLL4 humanos para construir cepas de células CHO-s que expresan proteínas DLL3 de diferentes especies para el posterior cribado e identificación de anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas relacionadas son las siguientes:

Proteína DLL3 humana de longitud completa (Uniprot, Q9NYJ7):

MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRV
CLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSF
IIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPP
AVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLE
GWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPR
GFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQP
CRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCA
LGFGGRDCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASAL
PAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPS
VHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSVDPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHT
GRAGQRQHLLFPYPSSILSVK

SEQ ID NO: 1

Proteína de longitud completa DLL3 de mono cinomolgo (Uniprot, A0A2K5WSR4):

MVSPRMSRLLSQTIVILALIFIPQARPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRV
CLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRDAWPGTFSL
IIETWREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCELP
AVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCLE
GWTGPLCMVPVSTSSCLGLRGPSSTTTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCP
RGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQ
PCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSC
ALGFGGRNCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGVS

ALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHAQDAGSRLLAGTP
EPSVHALPDALNNLRTQEGPGDVPSSSDWNRPEDVDSRGIYVISAPSIYAREVAMPLFPP
LHTGRAGQRQNLLFPFPSSILSVK

SEQ ID NO: 2

5 Proteína de longitud completa DLL3 de rata (Uniprot, O88671):
MVSLQVSSLPQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGGTTPRSPCNARGPCRLFFRVC
LKPGVSQEAAESLCALGAALSTSGPVYTEQPGVPAAALSLPDGLVRVPFLDAWPGTFSLII
ETWREQLGERAAGPAWNLLARVAGRRRLAAGAPWARDVQRTGAWELHFSYRARCEPP
AVGAACARLCRSRSAPSRCPGLRPCTPFPDECEAPRESLTVCRAGCSPEHGYCEEPDEC
10 HCLEGTGWLCTVPVSTSSCLNSRVSGPAGTGCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFE
CACPRGFYGRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPAFQGSNCERRVD
RCSLQPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGA
RRCSCALGFGGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGVRCEFAVRP
DGADAVPAAPRGLRQADSQRFLLPALGLLAAAALAGAALLLIHVRRRGPGRDTGTRLL
15 SGTREPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPTSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA

SEQ ID NO: 3

Proteína de longitud completa DLL3 de ratón (Uniprot, O88516):
MVSLQVSPLSQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPGLGTTPRSPCNARGPCRLFFRVC
LKPGVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLVRVPFRDAWPGTFSLV
20 IETWREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRLAAGGPWARDVQRTGTWELHFSYRARCEPP
AVGAACARLCRSRSAPSRCPGLRPCTPFPDECEAPSVCRPGCSPEHGYCEEPDECRCLE
GWTGWLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACP
RGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSL
QPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCS
25 CALGFGGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVCACAPGYMGVRCEFAVRPDGAD
AVPAAPRGLRQADPQRFLLPALGLLVAAGLAGAALLVIHVRRRGPGQDTGTRLLSGTRE
PSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPSSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREDWLIQVLF

SEQ ID NO: 4

Proteína humana DLL1 de longitud completa (Uniprot, O00548):
30 MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGAGPPPCACRT
FFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSPNIRFPFGFTWPGT
FSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRTDLKYSYRFVCD
EHYYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFCD
KPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGTCCQPWQCNCQEGWGGLFCNQDLNYCTH
35 HKPCKNGATCTNTGQGSYTCSCRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCDTLENSYSCT
CPPGFYGKICELSAMTCADGPCFNGGRCSDSPDGGYSCRCVPGYSGFNCEKKIDYCSSSP
CSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCTCP
GYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVV
DLTEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRGETET
40 MNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFDHGDHSADKNGFKARYPAVDYNLVQDLK
GDDTAVRDAHSKRDTKCQPQGSSEEGKTPTTLRGGEASERKRPDSGCSTSKDTKYQSV

YVISEEKDECVIATEV

SEQ ID NO: 5

Proteína humana DLL4 de longitud completa (Uniprot, Q9NR61):

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFR
 5 VCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
 AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
 GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAE
 CLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCK
 NGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGY
 10 YGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCAN
 GGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFS
 GRRCEVRTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFPVGLPPSFPWVAV
 SLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQ
 KKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFP HSDKSLGEKAPLRLHS
 15 EKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

SEQ ID NO: 6.

1.1. Construcción de cepas celulares con alta expresión de DLL3, DLL1 y DLL4

Un plásmido del vector de expresión lentiviral pCDH, compuesto por las SEQ ID NO: 1-
 6 (sintetizado por GENEWIZ), junto con un vector de empaquetamiento lentiviral pVSVG o pCMV,
 20 se transfectó en células 293T (Banco de Células de la Academia China de Ciencias, GNHu17)
 utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 3000 (Invitrogen, L3000015). Los
 sobrenadantes del medio de cultivo que contenían el virus se recogieron, se filtraron y se
 sometieron a ultracentrifugación. Tras descartar los sobrenadantes, se resuspendió en 0,2 mL
 de PBS estéril. Los virus concentrados se utilizaron para infectar células de ovario de hámster
 25 chino CHO-s (Invitrogen, R80007), DMS53 (ATCC, CRL-2062) y H82 (ATCC, HTB-175). Tras dos
 o tres semanas de cribado con puromicina, se realizó la clasificación de células individuales
 mediante FACS. Las cepas celulares monoclonales seleccionadas se expandieron y
 criopreservaron.

1.2. Preparación de antígenos

30 Se utilizaron secuencias de DLL3 humana (Uniprot, Q9NYJ7), DLL3 de mono cinomolgo
 (Uniprot, A0A2K5WSR4) y DLL3 de ratón (Uniprot, O88516) como plantillas para diseñar
 proteínas de fusión de ECD de DLL3 con diferentes marcadores. Estas proteínas de fusión se
 clonaron en vectores pTT5. Tras la expresión en células 293E, se obtuvieron los antígenos. Las
 secuencias de aminoácidos de las proteínas relacionadas son las siguientes:

35 1) His-hDLL3(ECD):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGHHHHHHHHHHHGGGGGSGGGGSAGVFELQIHSFGPGPGP
GAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLP

DGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQR
AGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGC
SPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCA
NGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPG
5 FQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACAN
GGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGSLVCACAPGY
MGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

SEQ ID NO: 7

Nota: La secuencia del péptido señal está resaltada con una línea punteada. La etiqueta his y el
10 enlazador están subrayados con una línea simple. La región extracelular de DLL3 está subrayada
con dos líneas.

2) Fc-hDLL3(ECD):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
15 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRV
CLKPGLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSF
20 FIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPP
AVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLE
GWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPR
GFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCR
NRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCA
25 LGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASAL
PAAPPGLRPGDPQRYL

SEQ ID NO: 8

Nota: La secuencia del péptido señal está resaltada con una línea punteada. La etiqueta Fc y el
30 enlazador están subrayados con una línea simple. La región extracelular de DLL3 está subrayada
con dos líneas.

3) hDLL3 (ECD)-gemelo:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKP
GLSEEAESPICALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIET
35 WREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVG
TACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWT
GPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFY
GLRCEVSGVTCADGPCFNGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCR
NGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGF
40 GGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPA
APPGLRPGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

SEQ ID NO: 9

Nota: La secuencia del péptido señal está resaltada con una línea punteada. La región extracelular de DLL3 está doblemente subrayada. La etiqueta gemela de estrep está subrayada con una sola línea.

5 4) DLL3 de cyno(ECD)-strep gemelo:

METDTLLLWVLLLVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARGPCRLFFRVCLKP
GLSEEAAESPCALGAALSARGPVYTEQPEAPAPDLPLPNGLLQVPFRDAWPGTFSLIET
WREELGDQIGGPAWSLLARVTRRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCELPAVG
TACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECEAPPVCRAGCSLEHGFCEQPGECRCLEGWT
10 GPLCMVPVSTSSCLGLRGPSTTTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPGSFECTCPRGF
YGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCR
NGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALG
FGGRNCRERADPCAARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGVSALPA
APPGLRPGDPQRYLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

15 SEQ ID NO: 10

Nota: La secuencia del péptido señal está resaltada con una línea punteada. La región extracelular de DLL3 está doblemente subrayada. La etiqueta gemela de estrep está subrayada con una sola línea.

20 5) DLL3 de mou(ECD)-strep gemelo:

METDTLLLWVLLLVPGSTGAGVFELQIHSFGPGPGLGTPRSPCNARGPCRLFFRVCLKP
GVSQEATESLCALGAALSTSVPVYTEHPGESAAALPLPDGLVRVPFRDAWPGTFSSLVIET
WREQLGEHAGGPAWNLLARVVGRRLAAGGPWARDVQRTGTWELHFSYRARCEPPAV
GAACARLCRSRSAPSRCGPGLRPCTPFPDECEAPSVCRPGCSPEHGYCEEPDECRCLEGW
25 TGPLCTVPVSTSSCLNSRVPGPASTGCLLPGPGPCDGNPCANGGSCSETSGSFECACPRGF
YGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGEDPDSAYVCHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPC
QNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGSRRCSAL
GFGGRDCRERADPCASRPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGVRCEFAVRPDGADAVP
AAPRGLRQADPQRFLWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

30 SEQ ID NO: 11

Nota: La secuencia del péptido señal está resaltada con una línea punteada. La región extracelular de DLL3 está doblemente subrayada. La etiqueta gemela de estreptococo está subrayada con una línea simple.

Ejemplo 2: Preparación de Anticuerpos Monoclonales de Ratón Anti-DLL3 Humana

35 1. Inmunización

Se produjeron anticuerpos monoclonales anti-DLL3 humana mediante la inmunización de ratones. Ratones SJL de laboratorio, hembras, de 6 a 8 semanas de edad (Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd., número de licencia de producción animal: SCXK(Shanghai)2017-0005). Entorno de alojamiento: SPF. Los ratones adquiridos se alojaron en un entorno de

laboratorio durante una semana, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 20-25°C y una humedad del 40-60%. Los ratones aclimatados se inmunizaron según el siguiente esquema.

Esquema de inmunización:

5 El antígeno inmunizante para el primer grupo de ratones fue His-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 7). Se realizaron inmunizaciones cruzadas utilizando los adyuvantes TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) y Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No. 77161). La proporción del antígeno al adyuvante TiterMax® Gold Adjuvant fue de 1:1, y la proporción del antígeno al adyuvante Thermo Imject® Alum fue de 3:1. La dosis para la primera inmunización fue de 50
10 µg/ratón/inmunización, y la dosis para la inmunización de refuerzo fue de 25 µg/ratón/inmunización. El antígeno se emulsionó antes de la inoculación. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 7, 14 y 21. Se recolectó sangre los días 7 y 21, y el suero del ratón se analizó para el título de anticuerpos por ELISA. Después de la cuarta inmunización, los ratones con títulos de anticuerpos altos y en meseta en su suero se seleccionaron para la fusión de
15 esplenocitos. Las inmunizaciones de refuerzo se realizaron 3 días antes de la fusión de los esplenocitos; a cada ratón se le inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 25 µg de solución de antígeno preparada en solución salina normal.

Los antígenos inmunizantes para el segundo grupo de ratones fueron DLL3 CHO-s y Fc-hDLL3(ECD) (SEQ ID NO: 8), y las inmunizaciones se realizaron alternadamente con
20 antígenos celulares y proteicos. Antes de la primera inmunización con células DLL3 CHO-s, a cada ratón se le inyectaron intraperitonealmente 0,1 mL de adyuvante TiterMax® Gold (Sigma Cat No. T2684) y, media hora después, se le inyectaron intraperitonealmente 0,1 mL de líquido celular diluido en solución salina normal a una concentración de 108/mL. Las células se pipetearon bien y se inoculó a los 0, 14, 28 y 42 días. Para el antígeno Fc-hDLL3(ECD), se
25 realizaron inmunizaciones cruzadas con los adyuvantes TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) y Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No. 77161). La proporción de antígeno/adyuvante TiterMax® Gold Adjuvant fue de 1:1, y la proporción de antígeno/adyuvante Thermo Imject® Alum fue de 3:1. La dosis para la primera inmunización fue de 50 µg/ratón/inmunización, y la dosis para la inmunización de refuerzo fue de 25
30 µg/ratón/inmunización. Para hDLL3-Fc, las inmunizaciones se realizaron los días 7, 21, 35 y 49. Se extrajo sangre los días 14, 35 y 49, y se analizó el título de anticuerpos en el suero del ratón mediante ELISA. Tras la octava inmunización, se seleccionaron ratones con títulos de anticuerpos altos y estables en el suero para la fusión de esplenocitos. Se realizaron inmunizaciones de refuerzo 3 días antes de la fusión de esplenocitos; a cada ratón se le
35 inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 50 µg de solución de antígeno de la proteína hDLL3-Fc preparada en solución salina normal.

2. Fusión de esplenocitos

Los linfocitos del bazo y las células de mieloma, células Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™), se fusionaron mediante un procedimiento optimizado de electrofusión para obtener células de hibridoma. Las células de hibridoma resultantes se resuspendieron en medio de cultivo completo (medio de cultivo IMDM con 20% de SFB, 1 × HAT y 1 × OPI) a una densidad de $3-4 \times 10^{-1}/\text{mL}$ y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 150 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$. Tras 3-4 días de incubación a 37°C con 5% de CO_2 , se eliminó el sobrenadante y se adicionó medio de cultivo completo HT (medio de cultivo IMDM con 20% de SFB, 1 × HT y 1 × OPI) a 200 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$. Tras 3 días de cultivo a 37°C con 5% de CO_2 , se realizaron el cribado y los ensayos. 3. Cribado de células de hibridoma y determinación de la secuencia de anticuerpos

Con base en la densidad de crecimiento de las células de hibridoma, el sobrenadante del cultivo de hibridoma se analizó mediante un método ELISA con unión a la proteína DLL3 y un método FACS con unión a células CHO-s DLL3. Se seleccionaron clones que se unen a la proteína DLL3 humana, a la proteína DLL3 de mono y a las células CHO-s DLL3, pero no a las células CHO-s de tipo silvestre, y se criopreservaron, expandieron, conservaron y subclonaron una o dos veces hasta obtener clones celulares individuales. Mediante el experimento de cribado descrito, se obtuvieron los clones de hibridoma mAb100 y mAb6.

Se expandieron los clones de hibridoma y se extrajo el ARN. Se realizó una amplificación por transcripción inversa (RT-PCR) utilizando un cebador degenerado de Ig de ratón, y finalmente se obtuvieron las secuencias de la región variable de los anticuerpos.

Región variable de cadena pesada de mAb6:

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGIINPYSGVTI
YNHKFKGKATLTVDKSSNTAYMELNSLTSEDSAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTSTV
VSS

SEQ ID NO: 12

Región variable de cadena ligera de mAb6:

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSI~~CH~~ASQGISGNMGWLQKPKGSFKGLIYHGANLEDGVP
SRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 13

Región variable de cadena pesada de mAb100:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIHY
ADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSED~~TAM~~YYCASPLYYYGRSYNAVAYWGQGTSTV
TVSS

SEQ ID NO: 14

Región variable de cadena ligera de mAb100:

DIQMNQSPSSLSASLGDTITIT~~CH~~ASQININVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASDLHTGVPSR
FSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIK

Tabla 4. Secuencias CDR de anticuerpos murinos

Anticuerpo	Nombre	Secuencia	No.
mAb6	HCDR1	DYYMN	SEQ ID NO: 16
	HCDR2	IINPYSGVTIYNHKFKG	SEQ ID NO: 17
	HCDR3	QDSLLDYAMDY	SEQ ID NO: 18
	LCDR1	HASQGISGNMG	SEQ ID NO: 19
	LCDR2	HGANLED	SEQ ID NO: 20
	LCDR3	VQYAQFPYT	SEQ ID NO: 21
mAb100	HCDR1	DSGMH	SEQ ID NO: 22
	HCDR2	YISSGSSTIHYADTVKG	SEQ ID NO: 23
	HCDR3	PLYYYGRSYNAVAY	SEQ ID NO: 24
	LCDR1	HASQNINWLS	SEQ ID NO: 25
	LCDR2	KASDLHT	SEQ ID NO: 26
	LCDR3	QQGQSYPLT	SEQ ID NO: 27

Nota: Los residuos de aminoácidos de los CDR del VH/VL se determinaron y anotaron utilizando el esquema de numeración de Kabat.

- 5 Las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos murinos se clonaron en plásmidos del vector pTT 5 que contenían una región constante de cadena pesada de IgG1 humana expuesta en SEQ ID NO: 28 y una región constante de cadena ligera κ expuesta en SEQ ID NO: 29, y luego las células HEK293 se transfectaron con los plásmidos resultantes para obtener los anticuerpos quiméricos anti-DLL3
- 10 M6CHI y M100CHI.

Región constante de cadena pesada de IgG1 humana:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 15 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28

Región constante de cadena ligera κ Humana:

20 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29.

Ejemplo 3: Humanización de Anticuerpos Monoclonales Murinos Anti-DLL3

Mediante la comparación con una base de datos de genes de la línea germinal de la región variable de la cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos de Kabat, se seleccionaron genes de la línea germinal de la región variable de la cadena pesada y ligera con alta homología como moldes, y las CDRs de los anticuerpos murinos se injertaron en los moldes humanos correspondientes para formar secuencias de la región variable estructuradas como FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Los aminoácidos de las regiones variables se sometieron a retromutación seguida de recombinación con regiones constantes (por ejemplo, la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 28) y la región constante de la cadena ligera κ humana (SEQ ID NO: 29) para obtener anticuerpos de longitud completa.

Para el anticuerpo mAb6, el molde para las regiones variables de la cadena ligera de la línea germinal humana FR1, FR2 y FR3 fue IGKV1-16*01, el molde para la región de la cadena ligera FR4 fue IGKJ4*01, el molde para las regiones variables de la cadena pesada de la línea germinal humana FR1, FR2 y FR3 fue IGHV1-3*01, IGHV7-4-1*02 o IGHV3-73*01, y el molde para la región de la cadena pesada FR4 fue IGHJ6*01. Para el anticuerpo mAb100, el molde para las regiones variables de la cadena ligera de la línea germinal humana FR1, FR2 y FR3 fue IGKV1-27*01, el molde para la región de la cadena ligera FR4 fue IGKJ4*01, el molde para las regiones variables de la cadena pesada de la línea germinal humana FR1, FR2 y FR3 fue IGHV3-11*01, y el molde para la región de la cadena pesada FR4 fue IGHJ6*01.

Además, el residuo de aminoácido en la posición 4 del HCDR3 de la región variable de la cadena pesada del mAb100 (PLYYYGRSYNAVAY (SEQ ID NO: 24)) se mutó de Y a H, o el residuo de aminoácido en la posición 11 se mutó de A a G para obtener un nuevo HCDR3: PLYHYGRSYNAVAY (SEQ ID NO: 30) o PLYYYYGRSYNGVAY (SEQ ID NO: 31).

Tabla 5. Plantillas de humanización y mutaciones puntuales correspondientes para los anticuerpos mAb6 y mAb100.

	VL		VH	
hAb6	VL1	Injerto (IGKV1-16*01) + F36L, S46G	VH1	Injerto(IGHV1-3*01) + Q1E, R71V, T73K
	VL2	Injerto(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y	VH2	Injerto(IGHV1-3*01) + Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL3	Injerto(IGKV1-16*01) + F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y	VH3	Injerto(IGHV1-3*01) + Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N
	VL4	Injerto(IGKV1-16*01) + F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D	VH4	Injerto(IGHV1-3*01) + Q1E, Q43K, I69L, R71V, T73K, S76N

	VL5	Injerto (IGKV1-16*01)	VH5	Injerto(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K
			VH6	Injerto(IGHV7-4-1*02) + Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH7	Injerto(IGHV3-73*01) + F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K, T93A
			VH8	Injerto(IGHV1-3*01)
			VH9	Injerto(IGHV7-4-1*02)
			VH10	Injerto(IGHV3-73*01)
			VH11	Injerto(IGHV7-4-1*02) + Q1E, R38K, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH12	Injerto(IGHV7-4-1*02) + Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
			VH13	Injerto(IGHV7-4-1*02) + Q1E, R38K, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N
hAb100	VL1	Injerto(IGKV1-27*01)	VH1	Injerto(IGHV3-11*01) + Q1E, R94S
	VL2	Injerto(IGKV1-27*01) + V43I	VH2	Injerto(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S
			VH3	Injerto(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, Y98H
			VH4	Injerto(IGHV3-11*01) + Q1E, S49A, R94S, A100EG
			VH5	Injerto(IGHV3-11*01)

Nota: Tomando como ejemplo el A100EG de la tabla, este representa la mutación de A en la posición 100E, bajo la numeración de Kabat, hasta G.

Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo humanizado obtenidas fueron las siguientes:

5 hAb6 VH1 (Q1E, R71V, T73K)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGIINPYSGV
 TIYNHKFKGRVTITV**D**KSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGT
 TVVSS

SEQ ID NO: 32

10 hAb6 VH2 (Q1E, I69L, R71V, T73K, S76N)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGIINPYSGV
 TIYNHKFKGRVTLT**V**DKSAN**T**AYMELSSLRSEDVAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGT

VTVSS

SEQ ID NO: 33

hAb6 VH3 (Q1E, M48I, V67A, I69L, R71V, T73K, S76N)

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWIGINPYSGVT
IYNHKFKGRATLTVDKSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO: 34

hAb6 VH4 (Q1E, Q43K, I69L, R71V, T73K, S76N)

10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGKRLEWMGINPYSGV
TIYNHKFKGRVTLTVDKSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO: 35

hAb6 VH5 (Q1E, F69L, L71V, T73K)

15 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGINPYSGV
TIYNHKFKGRFVLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO: 36

hAb6 VH6 (Q1E, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

20 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGINPYSGV
TIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO: 37

hAb6 VH7 (F27Y, S30T, I69L, R71V, D73K, T93A)

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYTFTDYYMNWVRQASGKGLEWVGINPYSGVT
IYNHKFKGRFTLSVDKSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO: 38

hAb6VH8 (Injerto IGHV1-3*01)

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGINPYSGV
TIYNHKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
TVSS

SEQ ID NO: 39

hAb6VH9 (Injerto IGHV7-4-1*02)

35 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGINPYSGV
TIYNHKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
TVSS

SEQ ID NO: 40

hAb6VH10 (Injerto IGHV3-73*01)

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMNWVRQASGKGLEWVGINPYSGVTI
YNHKFKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRQDSLLDYAMDYWGQGTTVT

VSS

SEQ ID NO: 41

hAb6VH11 (Q1E, R38K, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

5 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWMGIINPYSGV
TIYNHKFKGRFVLSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
 VTVSS

SEQ ID NO: 42

hAb6VH12 (Q1E, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

10 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGV
TIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
 VTVSS

SEQ ID NO: 43

hAb6VH13 (Q1E, R38K, V68A, F69L, L71V, T73K, V75S, S76N)

15 EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWMGIINPYSGV
TIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGTT
 VTVSS

SEQ ID NO: 44

hAb6 VL1 (F36L, S46G)

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHGANLEDGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 45

hAb6 VL2 (F36L, S46G, T69A, F71Y)

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHGANLEDGVP
 SRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 46

hAb6 VL3 (F36L, A43S, P44F, S46G, T69A, F71Y)

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISGNMGWLQQKPGKSFKGLIYHGANLEDGVP
 SRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 47

hAb6 VL4 (F36L, S46G, T69A, F71Y, T85D)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHGANLEDGVP
 SRFSGSGSGADYTLTISLQPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 48

hAb6VL5 (Injerto IGKV1-16*01)

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISGNMGWFQQKPGKAPKSLIYHGANLEDGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 49

hAb100 VH1 (Q1E, R94S)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIHY

ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 50

hAb100 VH2 (Q1E, S49A, R94S)

5 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIH
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 51

hAb100 VH3 (Q1E, S49A, R94S, Y98H)

10 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIH
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYHYGRSYNAVAYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 52

hAb100 VH4 (Q1E, S49A, R94S, A100EG)

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIH
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNGVAYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 53

hAb100VH5 (InjertoIGHV3-11*01)

20 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIHY
ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLYYYGRSYNAVAYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 54

hAb100 VL1 (InjertoIGKV1-27*01)

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASDLHTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 55

hAb100 VL2 (V43I)

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASDLHTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 56.

Nota: Las CDRs están subrayadas con una línea y los sitios de mutación con doble línea.

Tabla 6. Fórmulas generales para las CDRs del anticuerpo hAb100

Name	Sequence	Sequence No.
HCDR1	DSGMH	SEQ ID NO: 22
HCDR2	YISSGSSTIHYADTVKG	SEQ ID NO: 23
HCDR3	PLYX ₁ YGRSYNX ₂ VAY	SEQ ID NO: 57
LCDR1	HASQNINWLS	SEQ ID NO: 25
LCDR2	KASDLHT	SEQ ID NO: 26
LCDR3	QQGQSYPLT	SEQ ID NO: 27

En la tabla, X_1 es Y o H; X_2 es A o G.

Las combinaciones de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados ejemplares son las siguientes:

Tabla 7. Anticuerpos humanizados de mAb6

Región variable	VL1	VL2	VL3	VL4
VH1	hAb6L1H1	hAb6L2H1	hAb6L3H1	hAb6L4H1
VH2	hAb6L1H2	hAb6L2H2	hAb6L3H2	hAb6L4H2
VH3	hAb6L1H3	hAb6L2H3	hAb6L3H3	hAb6L4H3
VH4	hAb6L1H4	hAb6L2H4	hAb6L3H4	hAb6L4H4
VH5	hAb6L1H5	hAb6L2H5	hAb6L3H5	hAb6L4H5
VH6	hAb6L1H6	hAb6L2H6	hAb6L3H6	hAb6L4H6
VH7	hAb6L1H7	hAb6L2H7	hAb6L3H7	hAb6L4H7
VH11	hAb6L1H11	hAb6L2H11	hAb6L3H11	hAb6L4H11
VH12	hAb6L1H12	hAb6L2H12	hAb6L3H12	hAb6L4H12
VH13	hAb6L1H13	hAb6L2H13	hAb6L3H13	hAb6L4H13

- 5 Nota: hAb6L1H1 indica que el anticuerpo comprende la región variable de la cadena pesada hAb6VH1 y la región variable de la cadena ligera hAb6VL1, y que la secuencia de la región constante de la cadena pesada es SEQ ID NO: 28 y la secuencia de la región constante de la cadena ligera es SEQ ID NO: 29. Esto aplica a los demás.

Tabla 8. Anticuerpos humanizados de mAb100

Región variable	VL1	VL2
VH1	hAb100L1H1	hAb100L2H1
VH2	hAb100L1H2	hAb100L2H2
VH3	hAb100L1H3	hAb100L2H3
VH4	hAb100L1H4	hAb100L2H4

- 10 Nota: hAb100L1H1 indica que el anticuerpo comprende la región variable de la cadena pesada hAb100VH1 y la región variable de la cadena ligera hAb100VL1, y que la secuencia de la región constante de la cadena pesada es SEQ ID NO: 28 y la secuencia de la región constante de la cadena ligera es SEQ ID NO: 29. Esto aplica a los demás.

- 15 Los anticuerpos mencionados se clonaron, expresaron y purificaron, y mediante un ensayo de unión a proteínas (Ejemplo de Prueba 1), un ensayo de unión celular (Ejemplo de Prueba 2) y Biacore (Ejemplo de Prueba 4), se seleccionaron finalmente anticuerpos humanizados con buena actividad. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados ejemplares son las siguientes:

Cadena pesada de Hu6 (También referida como hAb6L4H12):

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMNWVRQAPGQGLEWMGIINPYSGV
TIYNHKFKGRFALSVDKSSNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARQDSLLDYAMDYWGQGT
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 5 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

SEQ ID NO: 58

Cadena ligera de Hu6 (También referida como hAb6L4H12):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISGNMGWLQQKPGKAPKGLIYHG
 15 ANLE
EDGVP
SRFSGSGSGADYTLTISSLPEDFADYYCVQYAQFPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

20 SEQ ID NO: 59

Cadena pesada de Hu100 (También referida como hAb100L1H1):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSGMHWRQAPGKGLEWVS
YISSGSSTIHY
ADTVKGRFTISRDN
 25 AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPLYYYGRSYNAVAYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

SEQ ID NO: 60

Cadena ligera de Hu100 (también referida como hAb100L1H1):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASDLHTGVP
 35 SRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

40 SEQ ID NO: 61.

El anticuerpo de control positivo utilizado en la presente invención fue BI-764532 (construido con referencia al documento WO2019234220A1), y el control negativo fue C25

(cuyas secuencias VH/VL provienen de la Patente No. US6114143A). Sus secuencias son las siguientes:

Cadena pesada de BI-764532:

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVHWVRQAPGQGLEWMVIINPGGGT
TSYAQKFLGRVTMTRDTSTNTVYMELKSLRSEDTAVYYCARGEAVTGNYFYYGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
10 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

SEQ ID NO: 62

15 Cadena ligera de BI-764532:

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRASQGISNYLVWFQQKPGKAPKRLIYAVSSLYSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

SEQ ID NO: 63

Cadena pesada de C25:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYT
25 NYNEIFKKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRGPYAMDYWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
30 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64

Cadena ligera de C25:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSLNSGDQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWAST
35 GESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQNDYSYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL
TSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

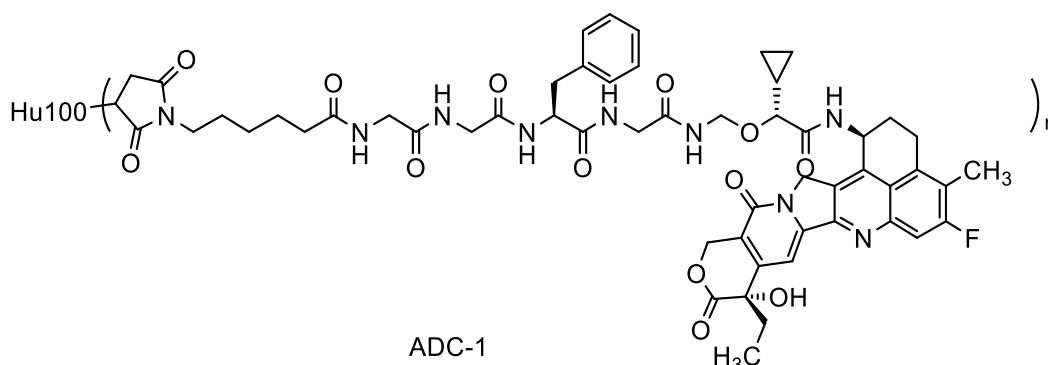
SEQ ID NO: 65.

Nota: En las secuencias, las regiones variables están subrayadas y las regiones constantes están en cursiva.

40

II. Preparación del ADC

Ejemplo 4. Preparación del ADC-1

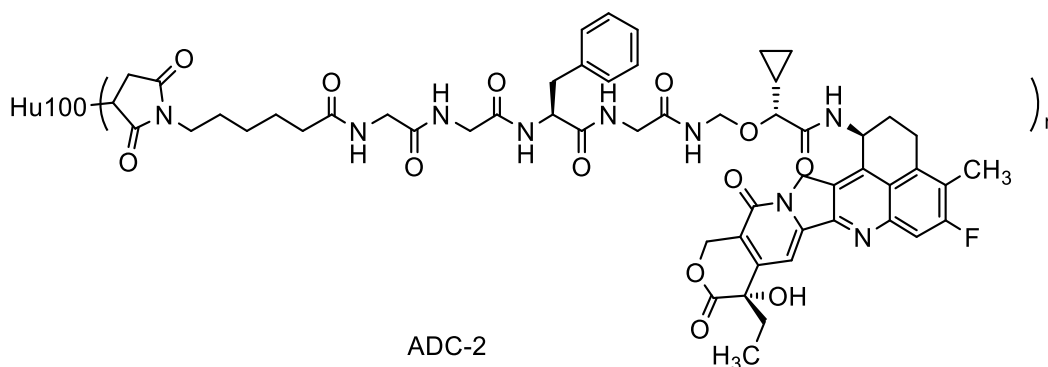


Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 50.7 μ L, 507 nmol) al anticuerpo **Hu100** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0,05 M; 10,0 mg/mL, 3 mL, 203 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (2,18 mg, 2030 nmol, preparado según el Ejemplo 9 de la Solicitud de Patente n.º WO2020063676A1) se disolvió en 150 μ L de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0,05 M a pH 6.5, con EDTA 0,001 M) para obtener el título del producto, **ADC-1**, en tampón de PBS (1.61 mg/mL, 15.1 mL). A continuación, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 4.43$.

Ejemplo 5. Preparación de ADC-2



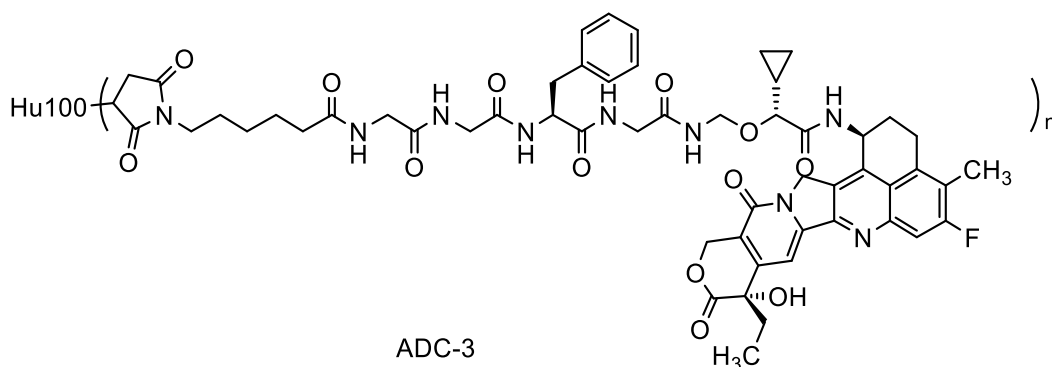
Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 121.7 μ L, 1217 nmol) al anticuerpo **Hu100** en una solución tampón acuosa

de PBS (pH 6.5, 0.05 M; 10.0 mg/mL, 3 mL, 203 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (3,27 mg, 3042 nmol) se disolvió en 150 µL de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0.05 M a pH 6,5, con EDTA 0,001 M) para obtener el título del producto, **ADC-2**, en tampón de PBS (1.42 mg/mL, 15.8 mL). A continuación, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 7.32$.

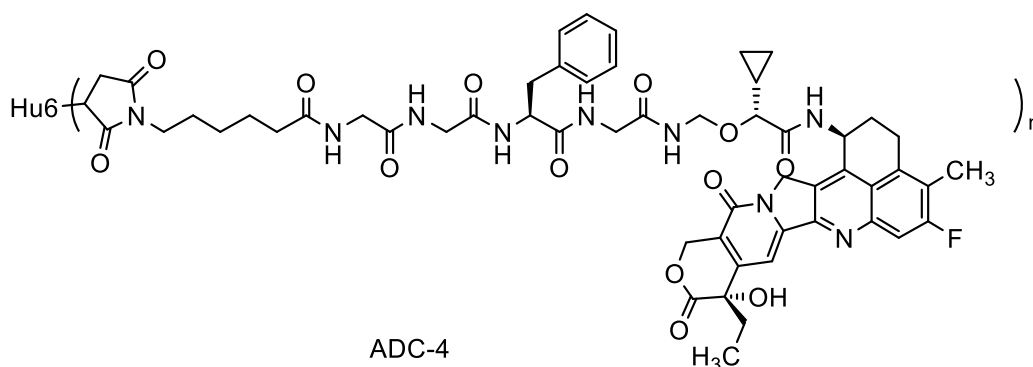
Ejemplo 6. Preparación de ADC-3



Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 159.4 µL, 1594 nmol) al anticuerpo **Hu100** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0.05 M; 10.0 mg/mL, 6.5 mL, 440 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (5.66 mg, 5265 nmol) se disolvió en 330 µL de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0,05 M a pH 6.5, con EDTA 0.001 M) para obtener el título del producto, **ADC-3**, en tampón de PBS (2.72 mg/mL, 19.2 mL). A continuación, el producto se refrigeró a 4°C.

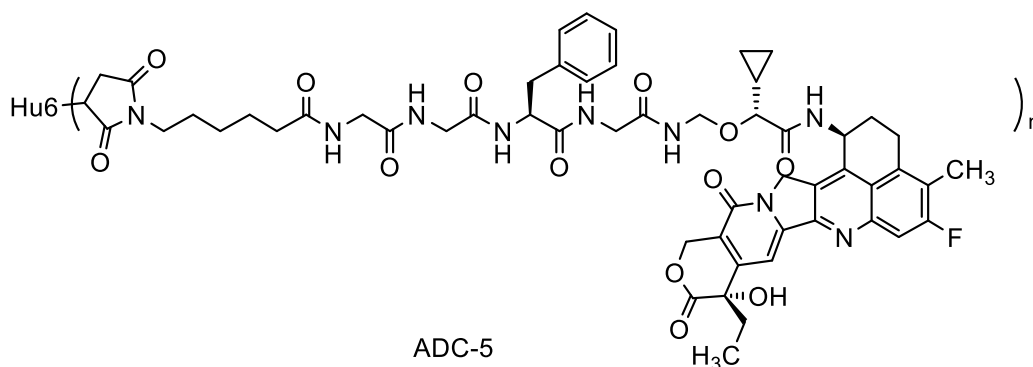
Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 6.12$.

Ejemplo 7. Preparación de ADC-4

Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 1.14 mL, 11.4 μ mol) al anticuerpo **Hu6** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0.05 M; 10.0 mg/mL, 76 mL, 5140 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (49.0 mg, 45.6 μ mol) se disolvió en 3.8 mL de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0.05 M a pH 6.5, con EDTA 0.001 M) para obtener el producto del título, **ADC-4**, en tampón de PBS (4.07 mg/mL, 167 mL). Posteriormente, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 3.53$.

Ejemplo 8. Preparación de ADC-5

Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 2.74 mL, 27.4 μ mol) al anticuerpo **Hu6** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0.05 M; 10.0 mg/mL, 68 mL, 4595 nmol) a 37°C.

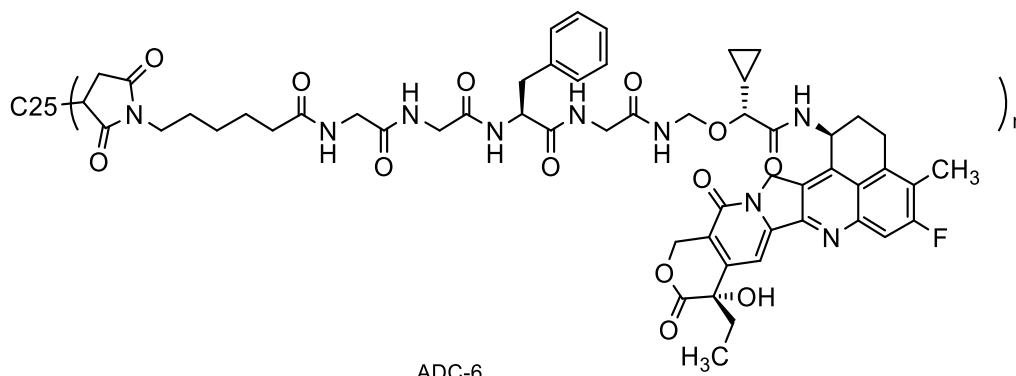
La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (82,75 mg, 77.04 µmol) se disolvió en 3.4 mL de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0.05 M a pH 6.5, con EDTA 0,001 M) para obtener el producto del título, **ADC-5**, en tampón de PBS (3.12 mg/mL, 174.1 mL). Posteriormente, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 7.43$.

10

Ejemplo 9. Preparación de ADC-6

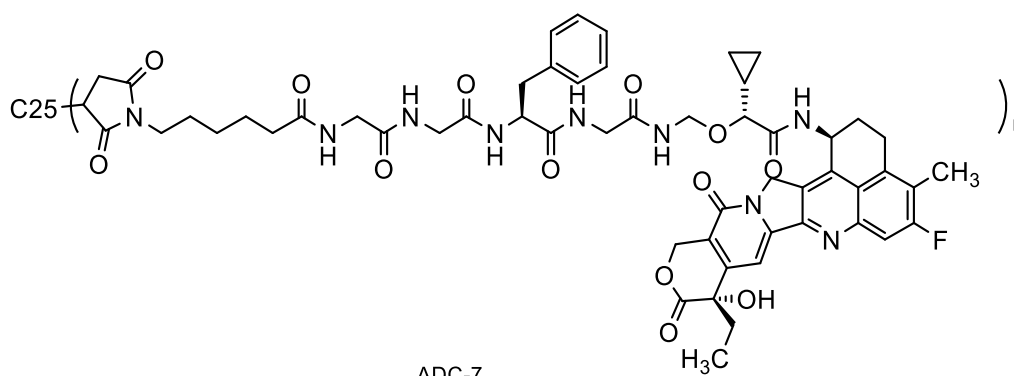


Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 35,6 µL, 356 nmol) al anticuerpo **C25** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0.05 M; 10.0 mg/mL, 1.6 mL, 108 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (1.39 mg, 1.294 µmol) se disolvió en 80 µL de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0.05 M a pH 6.5, con EDTA 0.001 M) para obtener el producto del título, **ADC-6**, en tampón de PBS (1.06 mg/mL, 12.3 mL). A continuación, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 6.76$.

25

Ejemplo 10. Preparación de ADC-7

Se adicionó una solución acuosa preparada de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP.HCl) (10 mM, 64.8 μ L, 648 nmol) al anticuerpo **C25** en una solución tampón acuosa de PBS (pH 6.5, solución tampón acuosa de PBS 0.05 M; 10.0 mg/mL, 1.6 mL, 108 nmol) a 37°C. La mezcla se agitó en un baño de agua a 37°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se enfrió a 25°C en un baño de agua.

El compuesto **9-A** (1.74 mg, 1.62 μ mol) se disolvió en 80 μ L de dimetilsulfóxido y la solución se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción anterior. La mezcla se agitó en un baño de agua a 25°C durante 3 h y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se desalinizó y se purificó utilizando una columna de gel Sephadex G25 (fase de elución: solución tampón acuosa de PBS 0.05 M a pH 6.5, con EDTA 0.001 M) para obtener el producto del título, **ADC-7**, en tampón de PBS (1.03 mg/mL, 11.9 mL). Posteriormente, el producto se refrigeró a 4°C.

Cálculo del valor medio mediante RP-HPLC: $n = 7.75$.

Análisis de la carga de fármacos en soluciones madre de ADC

Los ADC son conjugados anticuerpo-fármaco. Su mecanismo en el tratamiento de enfermedades consiste en la administración de los fármacos a las células mediante la acción de los anticuerpos, lo que las destruye o inhibe su crecimiento. La carga de fármacos desempeña un papel decisivo en la eficacia de los fármacos.

En la presente invención, se utilizó un método de RP-HPLC para analizar la carga de fármacos, y el proceso fue básicamente el siguiente:

Reactivos e instrumento:

Ácido trifluoroacético (TFA): fabricado por Sigma, 100 mL/botella; acetonitrilo: grado LC, 4 L/botella, fabricado por Thermo Fisher; DTT: fabricado por Sigma, 1 g/botella. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución: Agilent 1200.

Preparación de las soluciones:

1) Solución de DTT 0.25 M:

Ejemplo de preparación: Se pesaron 5,78 mg de DTT y se disolvieron completamente en 150 µL de agua purificada para obtener una solución de DTT 0.25 M. Posteriormente, la solución se conservó a -20°C.

2) Fase móvil A (0.1% de TFA en agua):

Ejemplo de preparación: Se dosificaron 1000 ml de agua purificada con una probeta graduada y se adicionó 1 ml de TFA. La solución se mezcló bien antes de su uso y se conservó a 2-8°C durante 14 días.

3) Fase móvil B (0.1% de TFA en acetonitrilo):

Ejemplo de preparación: Se dosificaron 1000 ml de acetonitrilo con una probeta graduada y se adicionó 1 ml de TFA. La solución se mezcló bien antes de su uso y se conservó a 2-8°C durante 14 días.

Un anticuerpo desnudo y una muestra de prueba (a una concentración de 1 mg/ml, aproximadamente 200 µL) se redujeron con 4 µL de DTT en un baño de agua a 37°C durante 1 h y luego se transfirieron a un inserto para la inyección de la muestra.

Condiciones de cromatografía:

Columna de cromatografía: Agilent PLRP-S 1000A 8 µm 4,6 × 250 mm; temperatura de la columna: 80°C;

Detector DAD: longitud de onda de detección: 280 nm; temperatura de la cámara de muestra: 4°C; caudal: 1 ml/min;

volumen de inyección: 40 µL;

el gradiente cromatográfico se muestra en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1

Tiempo (min)	Fase móvil A%	Fase móvil B%
0	80.0	20.0
5.00	64.0	36.0
32.00	40.0	60.0
32.10	80.0	20.0
45.00	80.0	20.0

Análisis de datos:

Tras comparar los espectros de la muestra y el anticuerpo desnudo, se identificaron las ubicaciones de las cadenas ligeras y pesadas, y posteriormente se integró el espectro de la muestra de prueba para calcular el valor de DAR. La fórmula de cálculo es la siguiente:

Tabla 9-2

Nombre	Número de fármacos ligados
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

Área total del pico LC = área del pico LC + área del pico LC+1

Área total del pico HC = área del pico HC + área del pico HC+1 + área del pico HC+2 + área del pico HC+3

$DAR\ LC = \Sigma(\text{número de fármacos ligados} \times \text{porcentaje del área del pico}) / \text{área total del pico LC}$

$DAR\ HC = \Sigma(\text{número de fármacos ligados} \times \text{porcentaje del área del pico}) / \text{área total del pico HC}$

$DAR = DAR\ LC + DAR\ HC$

A continuación, se validó la actividad de los anticuerpos y ADCs de la presente invención mediante pruebas bioquímicas.

Ejemplo de Prueba 1: Ensayo ELISA de Unión de Anticuerpos a Nivel de Proteína

Se sembró estreptavidina (abcam, ab136200, 1 µg/mL) a 100 µL/pocillo y la placa se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó 3 veces con 250 µL/pocillo de solución PBST (PBS con 0.1% Tween 20). La placa se bloqueó con 250 µL/pocillo de leche al 5% a 37°C durante 2 h. La placa se lavó 3 veces con 250 µL/pocillo de solución PBST. Se adicionó el antígeno DLL3 biotinilado (1 µg/mL) (SEQ ID NO: 9) y la placa se incubó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 3 veces con 250 µL/pocillo de solución PBST. Se formularon los anticuerpos Hu6 y Hu100

(concentración máxima 100 nM, diluidos en serie 4 veces) y la incubación se realizó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 6 veces con 250 µL/pocillo de solución PBST. Se adicionaron concentraciones de trabajo de IgG humana (H+L)-HRP (Jackson, 109-035-003, dilución 1:4000) a 100 µL/pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 6 veces con 250 µL/pocillo de solución de PBST. Se adicionó la solución de sustrato TMB (KPL, 5120-0077) a 100 µL/pocillo y el desarrollo de color se realizó a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se adicionó H₂SO₄ 1 M a 100 µL/pocillo para detener el desarrollo de color y se tomaron lecturas a 450 nm en el lector de microplacas (Molecular Devices, VERSA max).

Tabla 10. Actividad de unión a proteínas de los anticuerpos

Anticuerpo	E _{max} (valor OD)	EC ₅₀ (nM)
Hu100	2.05	0.05
Hu6	2.13	0.04

Los resultados muestran que: ambos anticuerpos Hu6 y Hu100 tienen excelentes capacidades para unirse a DLL3.

Ejemplo de Prueba 2: Ensayo de Unión de Anticuerpos por FACS a Nivel Celular

Se suspendieron células de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas que expresan DLL3: H1184 (ATCC, No. de cat. CRL-5858), DLL3/H82, DLL3 de cyno/CHO-s y DLL3 de rata/CHO-s a una concentración de 1×10^6 /ml en tampón FACS (BSA al 1 % + PBS a pH 7.4). Las suspensiones celulares se añadieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning, 3795) a una concentración de 100 µL/pocillo. La placa se centrifugó a 300 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpos de prueba a una concentración de 100 µL/pocillo. La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 1 h. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se añadieron concentraciones de trabajo de APC anti-IgG humana Fc (BioLegend, 410712) o PE F(ab')₂-IgG de cabra anti-humana (Invitrogen, H10104). La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 40 min. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se midió la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo Invitrogen y se calcularon los valores de CE50 para la unión de los anticuerpos a las células que expresan DLL3. Los resultados se muestran en las Tablas 11-1, 11-2, 11-3 y en las figuras 1A a 1C.

Tabla 11-1. Actividad de unión de los anticuerpos para DLL3 expresado en células.

Célula	H1184		DLL3 de cyno/CHO-s		DLL3 de rata/CHO-s	
Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)

Hu6	2073	0.06	1762	0.32	2112	1.42
Hu100	2112	0.15	2075	0.55	Sin unir	
BI-764532	1625	3.94	963	3.42	Sin unir	

Tabla 11-2. Actividad de unión de los anticuerpos contra las células DLL3/H82 que expresan DLL3 humana.

Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
M100CHI	13513	0.25
hAb100L1H1	14315	0.24
hAb100L1H2	14807	0.30
hAb100L1H3	14865	0.25
hAb100L1H4	14908	0.22
hAb100L2H1	14409	0.29
hAb100L2H2	14821	0.16
hAb100L2H3	14785	0.30
hAb100L2H4	13159	0.32

5

Tabla 11-3. Actividad de unión de los anticuerpos a las células H1184

Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
M6CHI	3367	0.14
hAb6L2H2	2193	0.06
hAb6L4H4	2312	0.06
hAb6L2H5	2486	0.06
hAb6L2H6	2422	0.05
hAb6L2H7	2196	0.07
hAb6L2H6	1699	0.04
hAb6L2H11	1959	0.04
hAb6L2H12	2145	0.10
hAb6L2H13	2105	0.10
hAb6L4H6	2004	0.17
hAb6L4H11	2188	0.07
hAb6L4H12	2131	0.05
hAb6L4H13	2118	0.09

Los resultados muestran que todos los anticuerpos de la presente invención pueden unirse específicamente a la DLL3 expresada en células, y entre estos anticuerpos, Hu6 mostró

una capacidad relativamente alta para unirse a células que expresan DLL3 de diferentes especies. Hu100 mostró una excelente capacidad para unirse a células que expresan DLL3 humana y de mono cinomolgo, pero Hu100 no se unió a células que expresan DLL3 de rata. BI-764532 solo mostró capacidad para unirse a células que expresan DLL3 humana y de mono cinomolgo, y su actividad de unión fue menor que la de Hu6 y Hu100.

Ejemplo de Prueba 3: Ensayo de Unión por FACS de Anticuerpos para Células DLL1 y DLL4

Se suspendieron células de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas que expresan DLL3: H1184 (ATCC, No. de cat. CRL-5858), DLL3/H82, DLL3 de cyno/CHO-s y DLL3 de Rata/CHO-s a una concentración de 1×10^6 /ml en tampón FACS (BSA al 1% + PBS a pH 7.4). Las suspensiones celulares se añadieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning, 3795) a una concentración de 100 μ L/pocillo. La placa se centrifugó a 300 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpos de prueba a una concentración de 100 μ L/pocillo. La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 1 h. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se añadieron concentraciones de trabajo de APC anti-IgG humana Fc (BioLegend, 410712) o PE F(ab')₂-IgG de cabra anti-humana (Invitrogen, H10104). La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 40 min. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se midió la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo Invitrogen y se calcularon los valores de CE50 para la unión de los anticuerpos a las células que expresan DLL3. Los resultados se muestran en las Tablas 11-1, 11-2, 11-3 y en las Figuras 1A a 1C.

Tabla 11-1. Actividad de unión de los anticuerpos para DLL3 expresado en células.

Célula	H1184		DLL3 de cyno/CHO-s		DLL3 de Rata/CHO-s	
Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
Hu6	2073	0.06	1762	0.32	2112	1.42
Hu100	2112	0.15	2075	0.55	Sin unión	
BI-764532	1625	3.94	963	3.42	Sin unión	

Tabla 11-2. Actividad de unión de los anticuerpos contra las células DLL3/H82 que expresan DLL3 humana.

Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
M100CHI	13513	0.25
hAb100L1H1	14315	0.24
hAb100L1H2	14807	0.30
hAb100L1H3	14865	0.25
hAb100L1H4	14908	0.22
hAb100L2H1	14409	0.29
hAb100L2H2	14821	0.16
hAb100L2H3	14785	0.30
hAb100L2H4	13159	0.32

Tabla 11-3. Actividad de unión de los anticuerpos a las células H1184

Anticuerpo	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
M6CHI	3367	0.14
hAb6L2H2	2193	0.06
hAb6L4H4	2312	0.06
hAb6L2H5	2486	0.06
hAb6L2H6	2422	0.05
hAb6L2H7	2196	0.07
hAb6L2H6	1699	0.04
hAb6L2H11	1959	0.04
hAb6L2H12	2145	0.10
hAb6L2H13	2105	0.10
hAb6L4H6	2004	0.17
hAb6L4H11	2188	0.07
hAb6L4H12	2131	0.05
hAb6L4H13	2118	0.09

Cyno

- 5 Las células humanas DLL1/CHO-s y DLL4/CHO-s transfectadas de forma estable se suspendieron a una concentración de 1×10^6 /ml en tampón FACS (con 1% de BSA y PBS a pH 7.4). Las suspensiones celulares se añadieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning, 3795) a una concentración de 100 μ L/pocillo. La placa se centrifugó a 300 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron los anticuerpos de prueba a una concentración
- 10 de 100 μ L/pocillo y la placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 1 h. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se añadieron concentraciones de trabajo del anticuerpo

secundario PE F(ab')₂-IgG de cabra anti-humana Fc (Invitrogen, H10104). La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 40 min. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se midió la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo Invitrogen.

Los resultados muestran que ni el anticuerpo Hu6 ni el Hu100 se unieron a DLL1 ni a
5 DLL4 humano.

Ejemplo de Prueba 4: Ensayo de Afinidad de Anticuerpos Biacore

Los anticuerpos de prueba se capturaron por afinidad utilizando un chip biosensor de proteína A (No. de cat. 29127556, Cytiva) durante 18 s. Posteriormente, los antígenos DLL3
10 humana (ACRO, DLL3-H52H4), DLL3 de mono (KACTUS, DLL-RM103) y DLL3 de ratón (KACTUS, DLL-MM103) se dejaron fluir a través de la superficie del chip durante 180 s, seguidos de 600 s de disociación. Las señales de reacción se detectaron en tiempo real con un instrumento Biacore 8K (Cytiva) para obtener curvas de asociación y disociación. Tras completar la
15 disociación en cada ciclo experimental, el chip biosensor se lavó y regeneró con una solución de glicina-ácido clorhídrico 10 mM (pH 1.5) (Cat. No. BR-1003-54, Cytiva). El ajuste de datos se realizó con un modelo 1:1. Los resultados se muestran en las Tablas 12-1, 12-2 y 12-3.

Tabla 12-1. Afinidad de anticuerpos

Anticuerpo Antígeno	Hu6 KD (M)	Hu100 KD (M)
DLL3 Humana	5.94E-10	4.71E-10
DLL3 de Mono	1.31E-09	1.11E-09
DLL3 de Ratón	6.52E-09	Sin unión

Tabla 12-2. Afinidad de los anticuerpos por la DLL3 humana

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
M100CHI	1.03E+06	5.46E-04	5.28E-10
hAb100L1H1	8.58E+05	3.74E-04	4.36E-10
hAb100L1H2	7.81E+05	3.65E-04	4.67E-10
hAb100L1H3	8.32E+05	3.52E-04	4.24E-10
hAb100L1H4	3.48E+05	2.54E-04	7.29E-10
hAb100L2H1	5.72E+05	6.29E-04	1.10E-09
hAb100L2H2	8.48E+05	3.70E-04	4.37E-10
hAb100L2H3	4.04E+05	2.68E-04	6.64E-10
hAb100L2H4	6.52E+05	6.55E-04	1.00E-09

Tabla 12-3. Afinidad de los anticuerpos por la DLL3 humana

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
M6CHI	9.65E+05	6.57E-04	6.81E-10
hAb6L1H1	7.98E+05	2.25E-03	2.81E-09
hAb6L1H2	7.87E+05	1.73E-03	2.19E-09
hAb6L1H3	8.12E+05	2.24E-03	2.76E-09
hAb6L2H1	7.09E+05	1.55E-03	2.19E-09
hAb6L2H2	7.04E+05	1.16E-03	1.64E-09
hAb6L2H3	6.95E+05	1.39E-03	2.01E-09
hAb6L3H1	7.15E+05	1.44E-03	2.02E-09
hAb6L3H2	7.16E+05	1.14E-03	1.59E-09
hAb6L3H3	7.18E+05	1.35E-03	1.88E-09
hAb6L4H4	7.43E+05	1.08E-03	1.45E-09
hAb6L2H5	8.10E+05	7.84E-04	9.69E-10
hAb6L2H6	8.63E+05	7.56E-04	8.77E-10
hAb6L2H7	6.70E+05	2.05E-03	3.06E-09
hAb6L2H11	2.06E+06	7.49E-04	3.63E-10
hAb6L2H12	1.98E+06	9.13E-04	4.61E-10
hAb6L2H13	2.10E+06	8.03E-04	3.82E-10
hAb6L4H6	1.91E+06	8.11E-04	4.24E-10
hAb6L4H11	2.14E+06	6.72E-04	3.14E-10
hAb6L4H12	2.06E+06	8.05E-04	3.91E-10
hAb6L4H13	2.16E+06	6.95E-04	3.22E-10

Los resultados muestran que los anticuerpos humanizados y quiméricos mAb100 y mAb6 pueden unirse específicamente a la DLL3 humana con una afinidad relativamente alta. El anticuerpo Hu6 mostró una afinidad relativamente alta por la DLL3 humana, de mono y de ratón; el anticuerpo Hu100 mostró una afinidad relativamente alta por la DLL3 humana y de mono, pero no se unió a la DLL3 de ratón.

Ejemplo de Prueba 5: Ensayo de Unión Competitiva de Epítomos de Anticuerpos

El anticuerpo BI-764532 (1 µg/mL) se sembró en placa a 100 µL/pocillo y la placa se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó tres veces con 250 µL/pocillo de solución de PBST. La placa se bloqueó con 250 µL/pocillo de leche al 5% a 37°C durante 2 h. La placa se lavó tres veces con 250 µL/pocillo de solución de PBST. Se añadió DLL3-Strep biotinilado (0,1

µg/ml, SEQ ID NO: 9). Se formularon los anticuerpos competitivos BI-764532, Hu6 y Hu100 (concentración máxima de 100 µg/ml, diluidos en serie 4 veces) y se incubó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 6 veces con 250 µl/pocillo de solución de PBST. Se añadió estreptavidina-peroxidasa (dilución 1:2000) (Jackson Immuno Research, 016-030-084) a 100 µl/pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 6 veces con 250 µl/pocillo de solución de PBST. Se añadió la solución de sustrato TMB (KPL, 5120-0077) a 100 µL/pocillo y el desarrollo de color se realizó a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se añadió H₂SO₄ 1 M a 100 µL/pocillo para detener el desarrollo de color y se tomaron lecturas en el lector de microplacas a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Los resultados muestran que no hubo competencia entre los anticuerpos Hu6 y Hu100 y BI-764532, lo que indica que los anticuerpos Hu6 y Hu100 se unen a epítomos diferentes a los de BI-764532.

Ejemplo de Prueba 6: Ensayo de Actividad Endocítica de Anticuerpos anti-DLL3

DT3C es una proteína de fusión expresada de forma recombinante y se forma mediante la fusión del fragmento A de la toxina de la difteria (solo la fracción de la toxina) y el fragmento 3C del estreptococo del grupo G (la fracción de unión a IgG). La proteína puede tener una alta afinidad por la fracción IgG del anticuerpo, entrar en las células durante la endocitosis del anticuerpo y liberar DT tóxico bajo la acción de la furina proteasa intracelular. DT puede inhibir la actividad de ribosilación de EF2-ADP, bloqueando el proceso de traducción de proteínas y, finalmente, causando la muerte celular. DT3C que no ha entrado en la célula no tiene actividad destructora celular. La actividad de endocitosis de los anticuerpos se evaluó en función de su capacidad destructora celular.

Procedimiento experimental

a. Se preparó una suspensión de células DMS53/DLL3 en medio de cultivo celular fresco RPMI1640 (GE, SH30809.01) con 20 % de FBS y se añadió a una placa de cultivo celular de 96 pocillos a razón de 2000 células/50 µL/pocillo. Las columnas 1 y 12 no contenían células añadidas, pero sí 50 µL de medio de cultivo. La placa se incubó a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante 16 h.

b. Se preparó una solución 4× de DT3C (9600 nM, expresada y purificada por Shanghai Panchao Biotechnology Co., Ltd.) en medio de cultivo sin suero y se filtró con un filtro de 0.22 µm. Se preparó una solución 4× de anticuerpo (1600 nM) en medio de cultivo sin suero. Se mezclaron 80 µL de la solución de DT3C y 80 µL de la solución de anticuerpo en una proporción 1:1 por volumen, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

c. La mezcla se diluyó 5 veces en serie con medio de cultivo sin suero para 9 concentraciones, siendo el décimo punto medio de cultivo puro.

d. Se añadieron 50 μ L del anticuerpo diluido a las células y la placa se incubó en una incubadora durante tres días.

5 e. Se añadió CTG (ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®, Promega, G7573) a 50 μ L/pocillo. La placa se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la quimioluminiscencia en Victor3.

Los resultados se muestran en la Tabla 13 a continuación y en la Figura 3.

Tabla 13. Muerte celular causada por endocitosis de anticuerpos

Anticuerpo	IC ₅₀ (nM)	I _{max}
Hu6	0.56	87.16
Hu100	1.47	86.13
BI-764532	3.27	86.51

10 Los resultados muestran que: ambos anticuerpos Hu6 y Hu100 pueden ser endocitados por las células.

Ejemplo de Prueba 7: Ensayo de Unión de ADC por FACS a Nivel Celular

Se suspendieron células hDLL3/CHO-s y cynoDLL3/CHO-s que expresaban DLL3 a una
 15 concentración de 1×10^6 /ml en tampón FACS (BSA al 1 % + PBS a pH 7,4). Las suspensiones se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, 3795) a una concentración de 100 μ L/pocillo. La placa se centrifugó a 300 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron diferentes concentraciones de ADC de prueba a una concentración de 100 μ L/pocillo. La placa se incubó en un refrigerador a 4°C durante 1 h. Tras tres lavados centrífugos a 300 g,
 20 se añadieron concentraciones de trabajo de APC anti-IgG humana Fc (BioLegend, 410712) o PE F(ab')₂-IgG de cabra anti-humana (Invitrogen, H10104). La placa se incubó en oscuridad en un refrigerador a 4°C durante 40 min. Tras tres lavados centrífugos a 300 g, se midió la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo Invitrogen y se calcularon los valores de CE50 para los anticuerpos que se unen a las células que expresan DLL3. Los
 25 resultados se muestran en la Tabla 14, Figuras 4A y 4B. Tabla 14. Actividad de unión de anticuerpos para DLL3 expresada en células

Tabla 14. Actividad de unión de los anticuerpos para DLL3 expresado en células

Célula	hDLL3/CHO-s		CynoDLL3/CHO-s	
ADC	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)

ADC-1	472	0.34	697	0.47
ADC-2	468	0.40	686	0.47
ADC-3	464	0.34	679	0.45

Los resultados muestran que todos los ADC de la presente invención pueden unirse específicamente a la DLL3 humana y de mono expresada en células, y que la unión de los ADC prácticamente no se vio afectada al aumentar el valor de DAR.

5

Ejemplo de Prueba 8: Ensayo de Afinidad de ADC con Biacore

Los anticuerpos de prueba se capturaron por afinidad utilizando un chip biosensor de proteína A (No. de cat. 29127556, Cytiva) durante 18 s. Posteriormente, los antígenos DLL3 humana (ACRO, DLL3-H52H4) y DLL3 de mono (KACTUS, DLL-RM103) se dejaron fluir a través de la superficie del chip durante 180 s, seguido de 600 s de disociación. Las señales de reacción se detectaron en tiempo real utilizando un instrumento Biacore 8K (Cytiva) para obtener curvas de asociación y disociación. Tras completar la disociación en cada ciclo experimental, el chip biosensor se lavó y regeneró con una solución de ácido clorhídrico-glicina 10 mM (pH 1.5) (No. Cat. BR-1003-54, Cytiva). El ajuste de datos se realizó mediante un modelo 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

10

15

Tabla 15. Afinidades de los ADC por DLL3 de diferentes especies

ADC	Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
ADC-1	hDLL3	1.22E+06	3.49E-04	2.87E-10
	mac DLL3	2.88E+05	4.09E-04	1.42E-09
ADC-2	hDLL3	1.45E+06	2.96E-04	2.04E-10
	mac DLL3	2.92E+05	3.54E-04	1.21E-09
ADC-3	hDLL3	1.27E+06	3.42E-04	2.69E-10
	mac DLL3	2.43E+05	3.87E-04	1.60E-09

Los resultados muestran que todos los ADC de la presente invención pueden unirse específicamente a las proteínas DLL3 humanas y de mono, y que la unión de los ADC prácticamente no se vio afectada al aumentar el valor de DAR.

20

Ejemplo de Prueba 9: Ensayo de Toxicidad de los ADC para Células con Diferentes Niveles de Expresión de DLL3

El procedimiento experimental fue el siguiente:

a. Se preparó una suspensión celular en medio de cultivo celular fresco con 10 % de FBS y se añadió a una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, 3903) a 135 μ L/pocillo. Las columnas 1 y 12 no contenían células añadidas, pero sí 135 μ L de medio de cultivo. La placa se incubó a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante 16 h.

5 b. Se prepararon soluciones de trabajo del primer pocillo de muestras de ADC (10 $\times$) en PBS y, con esta concentración inicial, se realizó una dilución seriada con PBS por el factor correspondiente. Se añadieron soluciones de ADC 10 $\times$ a 15 μ L/pocillo y la placa se incubó a 37°C con 5% de dióxido de carbono durante 6 días.

10 c. Se añadió CTG (Promega, G7573) a 70 μ L/pocillo. La placa se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la quimioluminiscencia en Victor3. Los datos se procesaron con GraphPad Prism5, donde el eje X representa la concentración de anticuerpos o ADC y el eje Y la intensidad de la luz.

Las densidades de siembra para diferentes células, las concentraciones de la solución de trabajo del primer pocillo (10x) y los factores de dilución se muestran en la Tabla 16.

15 Tabla 16. Densidades de siembra de células y concentraciones de la solución de trabajo del primer pocillo

Célula	Medio de cultivo	Número de células por pocillo	Concentración (10 $\times$, nM)
H1184	RPMI1640+5%FBS	2000	2560
DMS53	RPMI1640+20%FBS+1 $\times$ GlutaMAX	1000	6400
SK-MEL3	McCoy's 5A +15% FBS	1000	6400
CHO-K1	DMEM/F12(1:1)+10%FBS	500	6400

Las células utilizadas en el ensayo fueron las siguientes:

H1184 (+++) adquirida en la ATCC, CRL-5858;

20 DMS53 (++) adquirida en la ATCC, CRL-2062;

SK-MEL3 (+) adquirida en la ATCC, HTB-69;

CHO-K1 (-) adquirida en la ATCC, CCL-61.

“+” indica el nivel de expresión de DLL3 y “-” indica que DLL3 no se expresa.

Los resultados se muestran en la Tabla 17 y en las figuras 5A a 5D.

Tabla 17. Actividad destructora de los ADC contra células con diferentes niveles de expresión de DLL3.

ADC	H1184(+++)		DMS53(++)		SK-MEL3 (+)		CHO-K1	
	IC ₅₀ (nM)	Imax(%)	IC ₅₀ (nM)	Imax (%)	IC ₅₀ (nM)	Imax (%)	IC ₅₀ (nM)	Imax (%)
ADC-1	0.60	97.01	19.20	93.66	133.72	82.81	>600	11.13
ADC-2	0.16	97.97	11.06	95.03	33.68	87.81	>600	54.03
ADC-3	0.28	97.69	14.31	93.54	59.61	87.29	>600	25.43

- 5 Los resultados muestran que ADC-1, ADC-2 y ADC-3 tienen una actividad destructora relativamente fuerte contra las células diana y pueden destruir SK-MEL3, DMS53 y H1184 que expresan DLL3, pero no tienen efecto destructor sobre las células CHO-K1 negativas para DLL3.

Ejemplo de Prueba 10: Ensayo de Actividad Destructora de Células Espectadoras

- 10 Las células DMS53/DLL3high (células DMS53 transfectadas de forma estable con DLL3) y U-2OS (ATCC, HTB-96) se cultivaron con RPMI1640 + 20 % FBS + 1× Glutamax y McCoy's 5A + 10% FBS, respectivamente. Las células se tripsinizaron, se neutralizaron con medio de cultivo fresco y se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en RPMI1640 + 20% FBS + 1× Glutamax. Tras el recuento
- 15 celular, la densidad de células DMS53/DLL3high se ajustó a 9×10^{-1} células/ml y la de células U-2OS a 3×10^{-1} células/ml. Se añadieron 500 µL de células DMS53/DLL3high y 500 µL de células U-2OS a cada uno de los pocillos correspondientes de una placa de 12 pocillos. Se añadieron 500 µL de células U-2OS y 500 µL de líquido de cultivo RPMI1640 + 20% FBS + 1× Glutamax a los pocillos correspondientes de una placa de 12 pocillos. Las placas se incubaron a
- 20 37°C con 5% de dióxido de carbono durante 24 h. Se prepararon soluciones intermedias 40× (200 nM) de las muestras. Se tomaron 25 µL de cada una de las muestras de ADC y se añadieron a los pocillos correspondientes de las placas de 12 pocillos. Se preparó un grupo control de disolvente. Las placas se cultivaron a 37°C con dióxido de carbono al 5% durante 6 días. Las células de las placas de 12 pocillos se tripsinizaron y se neutralizaron con medio de cultivo fresco.
- 25 Se tomaron 20 µL de células y se añadieron 20 µL de azul tripán. Se realizó el recuento celular. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con 100 µL de tampón FACS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 µL de tampón FACS y se

añadieron 2 µg/mL de anticuerpo anti-DLL3 positivo. La suspensión se incubó en hielo durante 60 min. Las células se lavaron una vez con tampón FACS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min, y se añadió el anticuerpo secundario anti-APC anti-IgG humana Fc (100×). Las células se incubaron durante 30 min y se lavaron una vez con tampón FACS. Se añadieron 200 µL de tampón FACS para resuspender las células y la suspensión se analizó por FACS. Los datos de citometría de flujo se analizaron con FlowJo para obtener la proporción de DMS53/DLL3^{high} y se calculó la cantidad total de DMS53/DLL3^{high} y U-2OS. Los datos se representaron gráficamente con GraphPad Prism5, representando el eje X las diferentes muestras y el eje Y el número de células calculado. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Los resultados muestran que los ADC-1, ADC-2 y ADC-3 tienen efectos citotóxicos secundarios significativos.

Evaluación Biológica de la Actividad In Vivo

Ejemplo de Prueba 11-1: Evaluación de la Eficacia In Vivo en el Modelo Murino CDX de Células DMS53

Se inocularon por vía subcutánea 200 µL de células DMS53 de cáncer de pulmón microcítico humano (5×10^{-1} células, con 50 % de matrigel/ratón; ATCC, CRL-2062) en el flanco derecho de cada ratón Balb/c. Siete días después de la inoculación, cuando el volumen tumoral era de ~220 mm³, se excluyó a los ratones con sobrepeso o con tumores demasiado grandes o demasiado pequeños. Los ratones se aleatorizaron en grupos de 8 según el volumen tumoral, y la administración se inició ese mismo día. Los ADC se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 1,5 mg/kg una vez a la semana, y se realizaron un total de 2 administraciones. Tras la segunda administración, se interrumpió la administración y se observaron los resultados del crecimiento tumoral. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana y se registraron los datos. Los datos se registraron con el programa estadístico Excel: los promedios se calcularon con avg; los valores de la DE se calcularon con STDEV; los valores del EEM se calcularon con STDEV/SQRT (número de animales por grupo); los gráficos se generaron con el software GraphPad Prism, y el análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA de dos vías o de una vía.

El volumen tumoral (V) se calculó mediante la fórmula: $V = 1/2 \times L_{\text{long}} \times L_{\text{short}}^2$

Tasa relativa de proliferación tumoral T/C (%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$, donde T y C representan los volúmenes tumorales del grupo de tratamiento y del grupo control al final del experimento; T₀ y C₀ representan los volúmenes tumorales al inicio del experimento.

Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

Los resultados se muestran en la Tabla 18 y la Figura 7.

Tabla 18. Eficacia de los ADC contra tumores de xenoinjerto DMS53 en ratones desnudos con tumores

ADC	Dosis (mg/kg)	Día-16 TGI (%)	Día-24 TGI (%)
ADC-1	1.5	122	92
ADC-2	1.5	155	124
	0.5	138	100
ADC-4	1.5	134	100
ADC-5	1.5	155	125
	0.5	133	92

5 Los resultados muestran que, a una dosis de 1.5 mpk, tanto el ADC-1 como el ADC-4 pueden inhibir significativamente el crecimiento de tumores de xenoinjerto subcutáneos de células DMS53. A dosis de 0.5 mpk y 1.5 mpk, tanto ADC-2 como ADC-5 pueden inhibir significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos de xenoinjerto de células DMS53.

10 ***Ejemplo de Prueba 11-2: Evaluación de la Eficacia In Vivo en el Modelo Murino CDX de Células DMS53***

Se inocularon por vía subcutánea 200 μ L de células DMS53 de cáncer de pulmón microcítico humano (5×10^{-1} células, con 30 % de matrigel/ratón; ATCC, CRL-2062) en el flanco derecho de cada ratón Balb/c. Quince días después de la inoculación, cuando el volumen tumoral era de $\sim 180 \text{ mm}^3$, se excluyó a los ratones con sobrepeso o con tumores demasiado grandes o demasiado pequeños. Los ratones se aleatorizaron en grupos de 8 según el volumen tumoral, y la administración se inició ese mismo día. Los ADC se administraron intraperitonealmente a una dosis de 1.5 mg/kg o 0.5 mg/kg una vez por semana, en un total de dos administraciones. Tras la segunda administración, se interrumpió la administración y se observó el crecimiento tumoral.

20 El volumen tumoral y el peso corporal se midieron dos veces por semana y se registraron los datos. Los datos se registraron con el programa estadístico Excel: los promedios se calcularon con avg; los valores de DE se calcularon con STDEV; los valores de SEM se calcularon con STDEV/SQRT (número de animales por grupo); los gráficos se generaron con el software GraphPad Prism, y el análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA de dos vías o de

25 una vía. El volumen tumoral (V) se calculó mediante la fórmula: $V = 1/2 \times L_{\text{largo}} \times L_{\text{corto}}^2$

Tasa relativa de proliferación tumoral T/C (%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$, donde T y C representan los volúmenes tumorales del grupo de tratamiento y del grupo control al final del experimento; T₀ y C₀ representan los volúmenes tumorales al inicio del experimento.

Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

5 Los resultados se muestran en la Tabla 19 y la Figura 8.

Tabla 19. Eficacia de los ADC contra tumores de xenoinjerto DMS53 en ratones desnudos con tumores

ADC	Dosis (mg/kg)	Día-15 TGI (%)
ADC-1	1.5	70
ADC-3	1.5	103
	0.5	68

10 Los resultados muestran que todos los ADC de la presente invención pueden unirse específicamente a DLL3 expresada en células humanas y de mono, y que la unión de los ADC prácticamente no se vio afectada al aumentar el valor de DAR.

Ejemplo de Prueba 12: Evaluación de la Eficacia In Vivo en el Modelo Murino CDX de Células NCI-H1184

15 Se inocularon por vía subcutánea 200 μ L de células NCI-H1184 (6×10^{-1} células, con un 50 % de MatrixGel/ratón; ATCC, CRL-5858) en el flanco derecho de cada uno de 80 ratones NDG. Trece días después de la inoculación, cuando el volumen tumoral medio era de $\sim 185 \text{ mm}^3$, se excluyeron los ratones con sobrepeso o con tumores demasiado grandes o demasiado pequeños. Los ratones se aleatorizaron en 7 grupos de 9 según el volumen tumoral, y la

20 administración se inició ese mismo día, como se muestra en la Tabla 19. Se inyectaron anticuerpos intraperitonealmente durante 21 días. Se midieron el volumen tumoral y el peso corporal dos veces por semana y se registraron los datos. Los datos se registraron con el programa estadístico Excel: los promedios se calcularon con avg; los valores de DE se calcularon con STDEV; los valores de SEM se calcularon con STDEV/SQRT (número de animales por

25 grupo); los gráficos se generaron con el software GraphPad Prism, y el análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA de dos vías o de una vía.

El volumen tumoral (V) se calculó mediante la fórmula: $V = 1/2 \times L_{\text{largo}} \times L_{\text{corto}}^2$

Tasa relativa de proliferación tumoral T/C (%) = $(T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$, donde T y C representan los volúmenes tumorales del grupo de tratamiento y del grupo control al final del experimento; T₀ y C₀ representan los volúmenes tumorales al inicio del experimento.

Tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

5 Los resultados se muestran en la Tabla 20 y la Figura 9.

Tabla 20. Eficacia de los ADC contra tumores de xenoinjerto H1184 en ratones desnudos con tumores

ADC	Dosis (mg/kg)	Día-21 TGI (%)
ADC-2	1.5	101
ADC-3	1.5	91
ADC-6	1.5	39
ADC-7	1.5	40

10 Los resultados muestran que tanto el ADC-2 como el ADC-3 pueden inhibir significativamente el crecimiento de tumores NCI-H1184.

Ejemplo de Prueba 13: Estudio Farmacocinético en Ratas

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única de moléculas de ADC en ratas SD (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.).

15 Las moléculas de ADC se inyectaron por vía intravenosa a 3 mg/kg (n = 4/grupo) y se recogieron muestras de sangre del fondo del ojo de las ratas a los 5 min, 8 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d, 21 d y 28 d después de la administración. Las muestras de sangre se dejaron reposar a temperatura ambiente durante media hora para su aglutinación y, a continuación, se centrifugaron a 4°C a 1000 g durante 15 min, tras lo cual se recogió el suero. Se realizaron
20 mediciones bioanalíticas mediante el método HTRF para analizar muestras de suero de rata. Se utilizó DLL3 biotinilado para capturar el mAb, y un anticuerpo antitoxina biotinilado para capturar la toxina. El análisis cuantitativo del contenido de las muestras de prueba se realizó mediante una curva modelo de cuatro parámetros de un estándar. Los parámetros farmacocinéticos se analizaron utilizando un modelo no compartimental estándar del software WinNonlin (6.4). Los
25 resultados experimentales se muestran en la Tabla 21 y en las Figuras 10A a 10C.

Tabla 21. Farmacocinética de las moléculas de ADC en ratas

Parámetros	ADC-1		ADC-2		ADC-3	
	Anticuerpo total	ADC Intacto	Anticuerpo total	ADC Intaco	Anticuerpo total	ADC Intaco
$T_{1/2}$ (día)	11.7 ± 0.6	8.4 ± 0.3	7.4 ± 1.2	7.2 ± 0.7	10.6 ± 1.4	7.5 ± 0.5
AUC 0-t ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	6826	4904	5340	4618	6165	4475
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	43	45.4	38.2	39.5	54.6	52
CL (mL/día/kg)	8.9	13.7	12.6	14.5	10	15

Los resultados muestran que las AUC del anticuerpo total y del ADC intacto, medidas in vivo, para las moléculas de ADC fueron similares, lo que indica que las estructuras de ADC
5 intactas de las tres moléculas de ADC son estables.

Ejemplo de Prueba 14: Estudio Farmacocinético en Monos

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única de una molécula de ADC en monos cynomolgus (SuZhou XiShan ZhongKe Laboratory Animal Co., Ltd.).

La molécula de ADC se inyectó por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg ($n = 3/\text{grupo}$) y se recogieron muestras de sangre a los 5 min, 8 h, 1 d, 1,5 d, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d, 21 d y 28 d después de la administración. Las muestras de sangre recolectadas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante media hora para su aglutinación y luego se centrifugaron (4°C , 2600 g, 10 min). La capa superior del suero se recogió y se almacenó inmediatamente a -
15 60 $^\circ\text{C}$. Se realizaron mediciones bioanalíticas mediante el método DELFIA para analizar las muestras de suero recolectadas. El análisis cuantitativo del contenido de la muestra de prueba se realizó mediante una curva modelo de cuatro parámetros de un estándar. Los parámetros farmacocinéticos se analizaron utilizando un modelo no compartimental estándar del software WinNonlin (6.4). Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 22 y la Figura 11.

Tabla 22. Farmacocinética de la molécula de ADC en monos

Parámetros	Anticuerpo total	ADC Intact
$T_{1/2}$ (día)	9.9 ± 1.1	8.5 ± 0.1
AUC 0-t ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	27405	25702
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	294.81	304.94
CL (mL/día/kg)	7.88	8.59

Los resultados muestran que, tras la administración intravenosa de 10 mpk de ADC-2 a monos cynomolgus, las semividas del anticuerpo total y del ADC intacto fueron de 9.9 ± 1.1 días y $8.5 \pm 0,1$ días, respectivamente; las AUC del anticuerpo total y del ADC intacto fueron de 27.405 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ y 25.702 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$, respectivamente. La semivida del anticuerpo total fue sustancialmente consistente con la del ADC intacto en monos cynomolgus, y la relación AUC del ADC intacto respecto al anticuerpo total fue del 94%, lo que indica que el ADC-2 presenta una estabilidad relativamente buena en monos cynomolgus.