

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 681**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/US2014/017810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130879**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14753730 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2958944**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo anti-DLL3 y PBD y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.02.2013 US 201361768368 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.11.2019

73 Titular/es:

**ABBVIE STEMCENTRX LLC (50.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064-6400, US y
MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TORGOV, MICHAEL y
HOWARD, PHILIP WILSON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 731 681 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpo anti-DLL3 y PBD y usos de los mismos

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta solicitud se refiere en general a nuevos compuestos que comprenden anticuerpos anti-DLL3 o fragmentos inmunorreactivos de los mismos conjugados con pirrolobenzodiazepinas (PBDs) y al uso de los mismos para el tratamiento o la profilaxis del cáncer y cualquier recidiva o metástasis del mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La diferenciación y la proliferación de las células madre y las células progenitoras son procesos normales en curso que tienen lugar conjuntamente para apoyar el crecimiento del tejido durante la organogénesis, la reparación celular y el reemplazo celular. El sistema está estrechamente regulado para garantizar que solo se generen señales adecuadas en función de las necesidades del organismo. La proliferación y la diferenciación celular normalmente se producen solo cuando es necesario para reemplazar células dañadas o muertas, o para el crecimiento. Sin embargo, la interrupción de esos procesos puede estar desencadenada por muchos factores, incluyendo la falta o el exceso de abundancia de diversos productos químicos de la señalización, la presencia de microambientes alterados, mutaciones genéticas o una combinación de los mismos. Una interrupción de la proliferación y/o la diferenciación celular normal puede conducir a diversos trastornos, incluyendo enfermedades proliferativas como el cáncer.

15 Los tratamientos convencionales del cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Frecuentemente, estos tratamientos son ineficaces y una resección quirúrgica puede que no proporcione una alternativa clínica viable. Las limitaciones en el estándar actual de atención son particularmente evidentes en aquellos casos en los que los pacientes se someten a tratamientos de primera línea y luego recaen. En tales casos, frecuentemente surgen tumores refractarios, a menudo agresivos e incurables. Las tasas de supervivencia general frente a muchos tumores sólidos se han mantenido prácticamente sin cambios a lo largo de los años debido, al menos en parte, al fracaso de las terapias existentes para prevenir la recaída, la recidiva del tumor y la metástasis. Las restricciones terapéuticas de los tratamientos actualmente disponibles han resaltado la necesidad de desarrollar nuevos agentes que se dirijan de manera efectiva a las células tumorígenas y las eliminen con daños colaterales controlables.

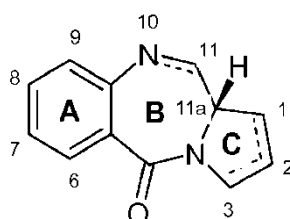
20 Un área prometedora para el desarrollo de tales agentes y tratamientos relacionados comprende terapias dirigidas que utilizan anticuerpos. En este sentido, se ha establecido una terapia con anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). Más específicamente, se ha mostrado que el uso de conjugados de anticuerpo y fármaco (es decir, ADCs o inmunoconjugados) que comprenden un componente dirigido al agente que se une a la célula y un componente de carga útil farmacológico para la administración localizada de agentes citotóxicos o citostáticos, favorece la acumulación intracelular del fármaco dentro de las células tumorales. Esa localización proporciona concentraciones relativamente altas de fármaco dentro del tumor, mientras que la administración sistémica de un fármaco no conjugado (es decir, no dirigido) para lograr la misma concentración tumoral, puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad para las células normales (Xie et al. (2006) *Expert Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun et al. (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law et al. (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu et al. (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

30 Desde un punto de vista clínico, tales conjugados de anticuerpo y fármaco pueden proporcionar de este modo una eficacia mejorada con una reducción correspondiente de la toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar el ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (mAbs), así como en el mecanismo de acción del fármaco, técnicas de conjugación y enlazadores, relación fármaco/anticuerpo (carga) y propiedades de liberación del fármaco (Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dorman et al. (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Doronina et al. (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson et al. (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8; Sanderson et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey et al. (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Con respecto a la selectividad de los anticuerpos y la localización del tumor, diversos marcadores tumorales conocidos han demostrado ser dianas de ADC ineficaces por una variedad de razones que incluyen la baja expresión, la falta de internalización, el desprendimiento, etc. La selección de constituyentes farmacológicos del ADC adecuados ha mostrado ser problemática en el pasado. Se han propuesto diversos agentes para uso en ADC que incluyen restos de fármacos que imparten efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión al ADN, la inhibición del proteasoma y/o la topoisomerasa. A pesar de algunos éxitos, ciertos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas. Por consiguiente, la selección de un agente de unión celular o de direccionamiento apropiado y una carga útil efectiva del fármaco como constituyentes del ADC, son importantes para proporcionar compuestos que muestran el perfil clínico deseado.

Una clase de compuestos que ha mostrado ser prometedor como carga útil potencial del ADC son las pirrolobenzo-

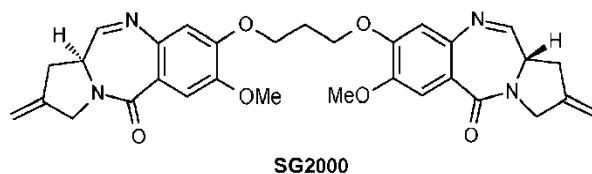
diazepinas (PBDs). En este sentido, las PBDs tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas del ADN, incluyendo la secuencia preferida PuGpu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, la antramycin, se descubrió en 1965 (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha descrito una serie de PBDs de origen natural, y más de 10 rutas sintéticas se han desarrollado para una variedad de análogos (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Los miembros de la familia incluyen abemicina (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (documento de patente japonesa 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)).

Las PBDs tienen la estructura general:



Se diferencian por el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en sus anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o un éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrofílico responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro a la derecha cuando se observa desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN de forma B, lo que conduce a un ajuste perfecto en el sitio de unión (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor, les permite interferir con el procesamiento del ADN, por lo tanto, su uso como agentes antitumorales.

Un compuesto de pirrolobenzodiazepina particularmente ventajoso está descrito por Gregson et al. (Chem. Commun. 1999, 797-798) como compuesto 1, y por Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) como compuesto 4a. Este compuesto, también conocido como SG2000, se muestra a continuación:



El documento WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos de PBD dímeros que tienen grupos enlazadores para la conexión con un agente de unión celular, como un anticuerpo. El enlazador está presente en el puente que une las unidades del dímero de monómeros de PBD.

El documento WO 2011/130598 ha descrito compuestos de PBD dímeros que tienen grupos enlazadores para la conexión con un agente de unión celular, tal como un anticuerpo. El enlazador en esos compuestos está fijado a una de las posiciones N10 disponibles y preferiblemente se escinde por acción de una enzima sobre el grupo enlazador.

El documento EP2530091 se refiere a un anticuerpo anti-DLL3.

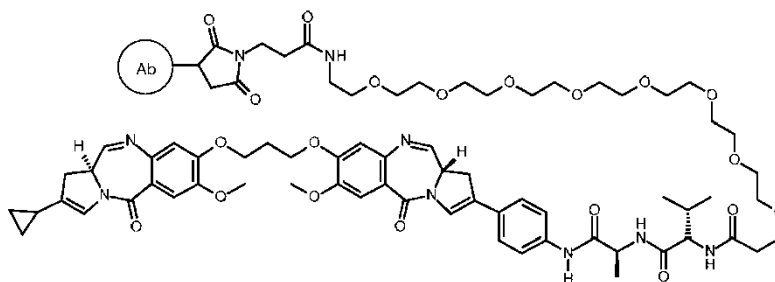
Aunque varios ADCs con PBD han mostrado ser prometedores para el tratamiento de ciertos trastornos proliferativos, sigue existiendo una necesidad en la técnica de compuestos dirigidos clínicamente eficaces y de métodos de uso de tales compuestos para tratar trastornos proliferativos.

40 COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Basándose en la descripción del presente documento, la presente invención proporciona el objeto definido en las reivindicaciones adjuntas.

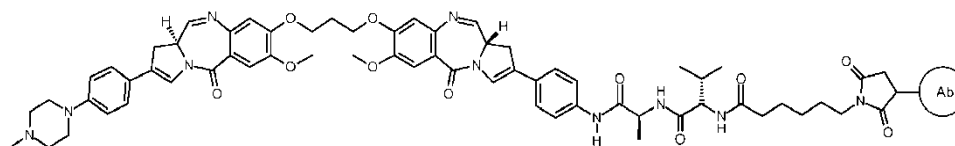
La presente descripción proporciona estos y otros objetivos que, en un sentido amplio, se dirigen a métodos, compuestos, composiciones y artículos manufacturados que comprenden ciertos conjugados de anticuerpo y fármaco

que comprenden PBDs seleccionadas que se pueden usar en el tratamiento de trastornos asociados con DLL3 (por ejemplo, trastornos proliferativos o trastornos neoplásicos). Con ese fin, la presente descripción proporciona anticuerpos contra el ligando 3 de tipo Delta (o DLL3) conjugados con PBDs seleccionadas que se dirigen de manera efectiva a células tumorales y/o células madre cancerosas y se pueden usar para tratar pacientes que padecen una amplia variedad de trastornos proliferativos y cualquier expansión, recidiva, recaída o metástasis de los mismos. En un aspecto amplio, la presente descripción se refiere a anticuerpos del ligando 3 de tipo Delta (DLL3) conjugados con pirrolobenzodiazepinas seleccionadas para proporcionar inmunocombinados de DLL3 sustancialmente indicados en los ADCs 1 - 5 inmediatamente a continuación. Por consiguiente, en un aspecto, la descripción se dirige a un conjugado seleccionado a partir del grupo que consiste en

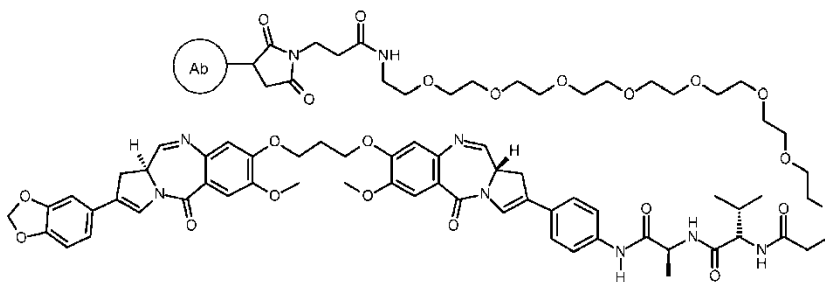


ADC 1

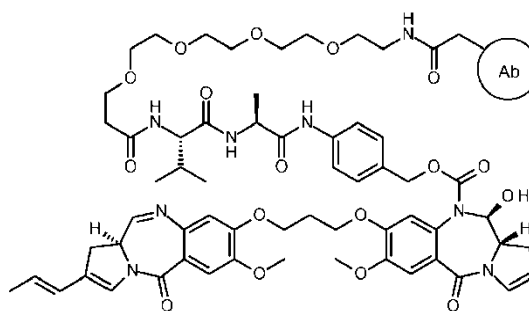
10



ADC 2

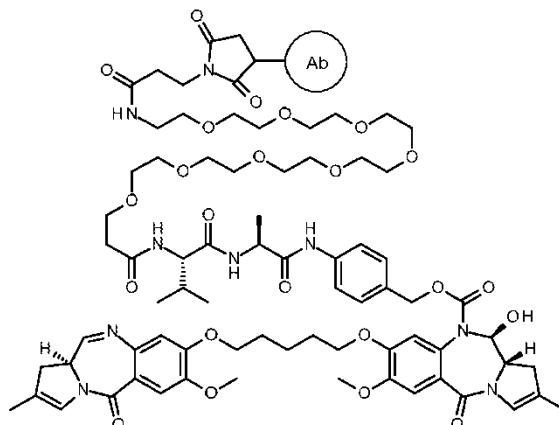


ADC 3



ADC 4

y



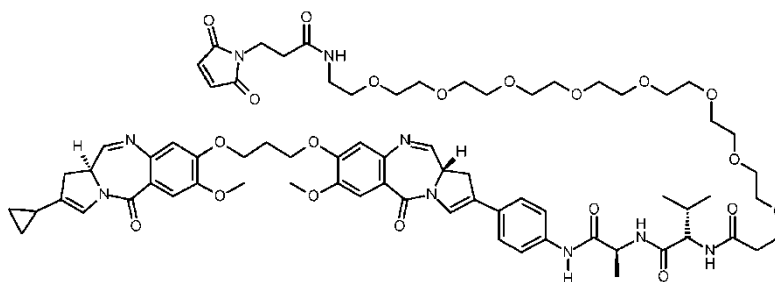
ADC 5

5 en donde Ab comprende un anticuerpo anti-DLL3 o un fragmento inmunorreactivo del mismo. La conjugación con el resto de fármaco y enlazador en cada uno de los conjugados es preferiblemente a través de un tiol libre en el anticuerpo anti-DLL3.

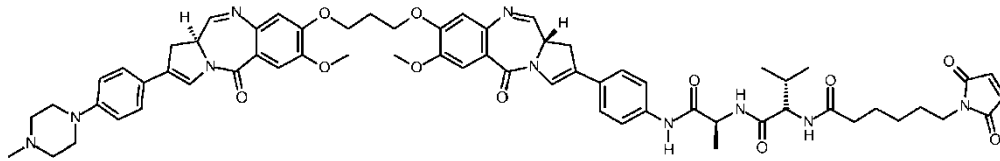
En otros aspectos, la presente descripción comprende una composición que comprende ADC 1, una composición que comprende ADC 2, una composición que comprende ADC 3, una composición que comprende ADC 4 o una composición que comprende ADC 5.

10 Como se ha indicado, esos conjugados se pueden usar para el tratamiento, el control, la mejora o la profilaxis de trastornos proliferativos o la recidiva o la progresión de los mismos. Los casos seleccionados de la presente descripción proporcionan el uso de tales conjugados de DLL3, para el tratamiento inmunoterapéutico de tumores malignos que comprenden preferiblemente una reducción en la frecuencia de células iniciadoras de tumores. Los ADCs descritos se pueden usar solos o junto con una amplia variedad de compuestos anticancerígenos, tales como agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) o modificadores de la respuesta biológica. En otros casos seleccionados, dos o más conjugados discretos de anticuerpo de DLL3 y fármaco se pueden usar en combinación para proporcionar efectos antineoplásicos mejorados.

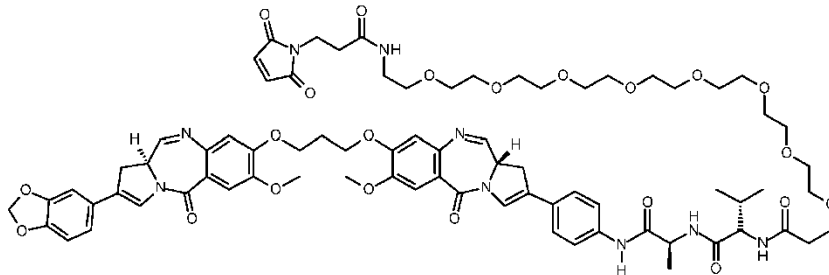
En otro aspecto, indicado en los Ejemplos adjuntos, la descripción proporciona un método para preparar los ADCs 1 - 5 que comprende conjugar un compuesto seleccionado a partir del grupo que consiste en



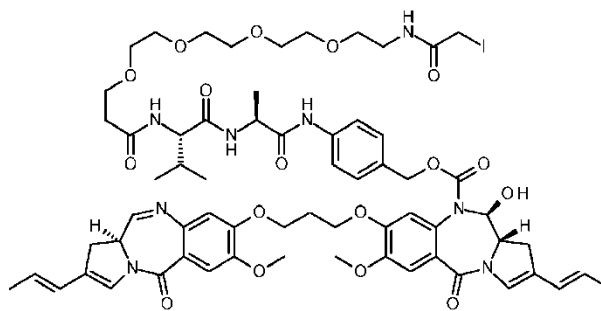
DL1



DL2

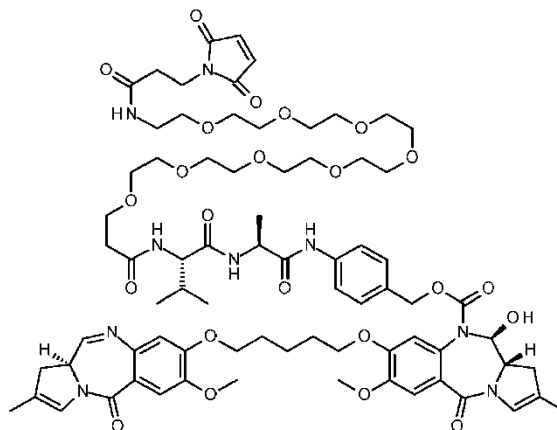


DL3



DL4

y



DL5

5

con un anticuerpo anti-DLL3 o un fragmento inmunorreactivo del mismo. Para los fines de la presente solicitud, DL

se usará como una abreviatura de "fármaco y enlazador" y comprenderá los enlazadores de fármacos 1 a 5 (es decir, DL1, DL2, DL3, DL4 y DL5) como se ha indicado anteriormente.

Se apreciará que el resto maleimido terminal añadido al enlazador (DL1 - DL3 y DL5) o el resto yodoacetamida (DL4) puede conjugarse con sulfhidrilo(s) libre(s) en el anticuerpo de DLL3 seleccionado, utilizando métodos reconocidos en la técnica. Además de que se va a exponer con más detalle a continuación, la ruta sintética para cada compuesto de DL 1 - 5 se proporciona en el Ejemplo 1 que se adjunta a este documento, mientras que los métodos específicos de conjugación de tales compuestos para proporcionar los ADCs 1 - 5 se exponen en el Ejemplo 7.

Téngase en cuenta que, para los fines de la presente solicitud, se apreciará que los términos "modulador" y "anticuerpo" se pueden usar indistintamente, a menos que el contexto lo indique lo contrario. De manera similar, las expresiones "conjugado anti-DLL3" y "conjugado de DLL3", o simplemente "conjugado", se refieren a los compuestos indicados como ADCs 1 - 5 que comprenden un anticuerpo anti-DLL3 y se pueden usar indistintamente a menos que el contexto indique lo contrario.

En cualquier caso, estos y otros objetivos se proporcionan en la presente descripción que, en un sentido amplio, se dirige a los conjugados de DLL3 mencionados anteriormente y a los métodos, composiciones y artículos manufacturados asociados que se pueden usar en el tratamiento de trastornos asociados con DLL3 (por ejemplo, trastornos proliferativos o trastornos neoplásicos). Para ese fin, la presente descripción proporciona nuevos conjugados de anticuerpos del ligando 3 de tipo Delta (o DLL3) que se dirigen de manera efectiva a las células tumorales y/o a las células madre cancerosas y se pueden usar para tratar pacientes que padecen una amplia variedad de tumores malignos. Como se explicará con más detalle en el presente documento, existen al menos dos isoformas o variantes de DLL3 que se presentan de forma natural y los moduladores descritos pueden comprender o asociarse selectivamente con una isoforma o la otra o con ambas. Además, en ciertas realizaciones, los moduladores de DLL3 descritos pueden reaccionar adicionalmente con uno o varios miembros de la familia de DLL (por ejemplo, DLL1 o DLL4) o, en otras realizaciones, pueden generarse y seleccionarse para asociarse o reaccionar exclusivamente con una o varias isoformas de DLL3.

Además, se apreciará que los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos pueden comprender cualquier modulador, anticuerpo o fragmento inmunorreactivo del mismo que reconozca, compita, sea agonista, sea antagonista, interaccione, se una o se asocie con un determinante de DLL3 (o un fragmento del mismo) y module, ajuste, altere, regule, cambie o modifique el impacto de la proteína DLL3 en una o varias vías fisiológicas y/o inhiba o elimine las células asociadas a DLL3. Por lo tanto, en un sentido amplio, la presente descripción se dirige en general a conjugados de DLL3 y a usos de los mismos. Además, como se explica ampliamente a continuación, tales conjugados de anticuerpo y fármaco se pueden usar para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de trastornos proliferativos, incluido el cáncer.

Con respecto a los ADCs 1 - 5, se apreciará que los anticuerpos compatibles pueden asumir cualquiera entre una serie de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales y monoclonales, quiméricos, con CDRs injertadas, anticuerpos humanizados y humanos y fragmentos inmunorreactivos y/o variantes de cada uno de los anteriores. Los casos preferidos comprenderán anticuerpos que son relativamente no inmunógenos, tales como estructuras artificiales humanizadas o completamente humanas. Por supuesto, de cara a la presente descripción, los expertos en la materia podrían identificar fácilmente una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) asociadas con regiones variables de las cadenas pesada y ligera de moduladores de anticuerpos de DLL3 y usar esas CDRs para modificar genéticamente o producir anticuerpos quiméricos, humanizados o con CDRs injertadas, sin una experimentación indebida. Por consiguiente, en ciertos casos preferidos, el componente de anticuerpo de DLL3 de los ADCs descritos comprende un anticuerpo que incorpora una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) como se definen en las FIGS. 3A y 3B y que se obtienen a partir de regiones variables murinas contiguas de cadena ligera (FIG. 3A) o pesada (FIG. 3B) (SEQ ID NOS: 21 - 387, números impares) que se indican en las mismas. Las secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada humanizadas (con CDRs injertadas) a modo de ejemplo también se muestran en la FIG. 3 que comprenden las SEQ ID NOS: 389 - 407. En realizaciones preferidas, los anticuerpos que comprenden las CDRs indicadas en las FIGS. 3A y 3B, comprenderán anticuerpos monoclonales y, en realizaciones aún más preferidas, comprenderán anticuerpos quiméricos, con CDRs injertadas o humanizados. Las secuencias de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican cada una de las secuencias de aminoácidos indicadas en las FIGS. 3A y 3B, se adjuntan a este documento en la lista de secuencias.

En otro caso más, un anticuerpo de la descripción comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos ejemplares descritos en el presente documento, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-DLL3 de la descripción.

Más particularmente, en casos seleccionados, los anticuerpos incluidos en cualquiera de los ADCs 1 - 5 pueden comprender un anticuerpo o un fragmento inmunorreactivo del mismo que tiene una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69,

SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 357, SEQ ID NO: 361, SEQ ID NO: 365, SEQ ID NO: 369, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 381 y SEQ ID NO: 385, y en donde dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo con consistente en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 355, SEQ ID NO: 359, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 367, SEQ ID NO: 371, SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 383 y SEQ ID NO: 387. En otras realizaciones preferidas, los moduladores seleccionados comprenderán regiones variables de cadena pesada y ligera que son 65, 70, 75 u 80% homólogas a las secuencias murinas mencionadas anteriormente. En aún otras realizaciones, los moduladores comprenderán secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera que son 85, 90 o incluso 95% homólogas a las secuencias murinas descritas. A este respecto, se apreciará que los anticuerpos humanizados obtenidos a partir de anticuerpos de origen murino tienen normalmente regiones variables de cadena pesada y ligera que son preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 85% homólogas con respecto al anticuerpo de origen. A modo de comparación, los anticuerpos humanizados normalmente tendrán regiones variables de cadena pesada y ligera que son preferiblemente de aproximadamente 80% a aproximadamente 95% homólogas a las del anticuerpo humano aceptor.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos seleccionados comprenderán una o varias CDRs obtenidas a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y pesada anteriores. En consecuencia, los casos seleccionados de la descripción incluyen un modulador de DLL3 que comprende una o varias CDRs procedentes de una cualquiera de SEQ ID NO: 21 a 387, números impares. Preferiblemente, los anticuerpos comprenderán tres CDRs de cadena ligera obtenidas a partir de una única secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera indicada en la FIG. 3A y tres CDRs de cadena pesada obtenidas a partir de una única secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada indicada en la FIG. 3B. Por ejemplo, los anticuerpos ejemplares pueden comprender tres CDRs de cadena ligera obtenidas a partir de una única secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera indicada en la FIG. 3A y tres CDRs de cadena pesada procedentes de una única secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada indicada en la FIG. 3B, en donde las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada proceden del mismo clon. En aún otras realizaciones, los conjugados de la presente invención comprenderán cualquier anticuerpo o fragmento inmunorreactivo del mismo que compita en la unión con cualquiera de los moduladores anteriores.

Por lo tanto, otro aspecto de la descripción comprende ADCs que incorporan anticuerpos obtenidos o derivados de SC16,3, SC16,4, SC16,5, SC16,7, SC16,8, SC16,10, SC16,11, SC16,13, SC16,15, SC16,18, SC16,19, SC16,20, SC16,21, SC16,22, SC16,23, SC16,25, SC16,26, SC16,29, SC16,30, SC16,31, SC16,34, SC16,35, SC16,36, SC16,38, SC16,41, SC16,42, SC16,45, SC16,47, SC16,49, SC16,50, SC16,52, SC16,55, SC16,56, SC16,57, SC16,58, SC16,61, SC16,62, SC16,63, SC16,65, SC16,67, SC16,68, SC16,72, SC16,73, SC16,78, SC16,79, SC16,80, SC16,81, SC16,84, SC16,88, SC16,101, SC16,103, SC16,104, SC16,105, SC16,106, SC16,107, SC16,108, SC16,109, SC16,110, SC16,111, SC16,113, SC16,114, SC16,115, SC16,116, SC16,117, SC16,118, SC16,120, SC16,121, SC16,122, SC16,123, SC16,124, SC16,125, SC16,126, SC16,129, SC16,130, SC16,131, SC16,132, SC16,133, SC16,134, SC16,135, SC16,136, SC16,137, SC16,138, SC16,139, SC16,140, SC16,141, SC16,142, SC16,143, SC16,144, SC16,147, SC16,148, SC16,149 y SC16,150; o cualquiera de los anticuerpos identificados anteriormente, o versiones quiméricas o humanizadas de los mismos. En otras realizaciones, los ADCs de la invención comprenderán un anticuerpo de DLL3 que tiene una o varias CDRs, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs, de cualquiera de los moduladores mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la presente descripción comprenderá un conjugado en el que el anticuerpo anti-DLL3 o un fragmento inmunorreactivo del mismo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 357, SEQ ID NO: 361, SEQ ID NO: 365, SEQ ID NO: 369, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 381 y SEQ ID NO: 385, y en donde dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 355, SEQ ID NO: 359, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 367, SEQ ID NO: 371, SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 383 y SEQ ID NO: 387. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden incluir una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un mismo clon identificado en las FIGS. 3A y 3B.

En aún otras realizaciones compatibles, los conjugados de anticuerpo y fármaco de la presente invención comprenderán uno de los anticuerpos de DLL3 injertados con CDR, o humanizado, hSC16.13, hSC16.15, hSC16.25, hSC16.34 y hSC16.56.

Otras realizaciones están dirigidas a ADCs que comprenden un anticuerpo en donde dicho anticuerpo comprende:

una cadena ligera de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 408, una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 409 y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 410; y

una cadena pesada de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 411, una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 412 y una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 413.

En otra realización, la invención se dirige a ADCs que comprenden un anticuerpo en donde dicho anticuerpo comprende:

una cadena ligera de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 414, una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 415 y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 416; y

una cadena pesada de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 417, una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 418 y una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 419.

En otra realización, la invención se dirige a ADCs que comprenden un anticuerpo en donde dicho anticuerpo comprende:

una cadena ligera de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 420, una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 421 y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 422; y

una cadena pesada de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 423, una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 424 y una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 425.

5 En otra realización, la invención se dirige a ADCs que comprenden un anticuerpo en donde dicho anticuerpo comprende:

una cadena ligera de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 426, una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 427 y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 428; y

10 una cadena pesada de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 429, una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 430 y una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 431.

En otra realización, la invención se dirige a ADCs que comprenden un anticuerpo en donde dicho anticuerpo comprende:

15 una cadena ligera de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 432, una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 433 y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 434; y

una cadena pesada de anticuerpo que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 435, una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 436 y una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 437.

20 En ciertas realizaciones preferidas, cada uno de los anticuerpos mencionados anteriormente comprende anticuerpos humanizados. Además, tal y como se describe en este documento, las secuencias de ácido nucleico que codifican tales regiones variables de cadena pesada y ligera humanizadas ejemplares, se indican en la lista de secuencias adjunta.

25 Además, un aspecto de la descripción puede comprender la asociación terapéutica de polipéptidos de DLL3 con células madre del cáncer. Así, en ciertos otros casos, la descripción comprenderá un conjugado de DLL3 de los ADCs 1 - 5 que reduce la frecuencia de células iniciadoras de tumores tras la administración a un sujeto. Preferiblemente la reducción en la frecuencia se determinará usando un análisis de dilución limitante *in vitro* o *in vivo*. En casos particularmente preferidos, ese análisis se puede llevar a cabo usando un análisis de dilución limitante *in vivo* que comprende el trasplante de células tumorales humanas vivas en ratones inmunocomprometidos. Alternativa-
30 mente, el análisis de dilución limitante se puede realizar usando un análisis de dilución limitante *in vitro* que comprende el depósito con dilución limitante de células tumorales humanas vivas en condiciones de apoyo de una colonia *in vitro*. En cualquier caso, el análisis, el cálculo o la cuantificación de la reducción en la frecuencia comprenderán preferiblemente el uso de estadísticas de distribución de Poisson para proporcionar una contabilidad precisa. Se apreciará que, si bien se prefieren tales métodos de cuantificación, también se pueden usar otras metodologías que
35 requieran menos trabajo, como la citometría de flujo o la inmunohistoquímica para proporcionar los valores deseados y que, por lo tanto, se contemplan expresamente como que están dentro del alcance de la presente descripción. En tales casos, la reducción en la frecuencia puede determinarse mediante un análisis de citometría de flujo o una detección inmunohistoquímica de marcadores de superficie de células tumorales que se sabe que enriquecen las células iniciadoras de tumores.

40 A este respecto, se apreciará que la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los inmunógenos de DLL3 están asociados terapéuticamente con células que perpetúan tumores (es decir, células madre cancerosas) que están involucradas en la etiología de diversos trastornos proliferativos, incluyendo la neoplasia. Más específicamente, la presente solicitud describe que la administración de los conjugados de DLL3 descritos puede mediar, reducir, agotar, inhibir o eliminar la señalización tumorigénica a través de células iniciadoras de tumores
45 (por ejemplo, reducir la frecuencia de células iniciadoras de tumores). Esta señalización reducida, ya sea por reducción, neutralización, reducción, eliminación, reprogramación o silenciamiento de las células iniciadoras de tumores o modificando la morfología de las células tumorales (p. ej., diferenciación inducida, rotura de nicho), a su vez permite el tratamiento más efectivo de los trastornos asociados con DLL3 al inhibir la tumorigénesis, el mantenimiento, la expansión y/o la metástasis de tumores y la recidiva.

50 Además de la asociación mencionada anteriormente con las células madre del cáncer, existe una evidencia de que las isoformas de DLL3 pueden estar implicadas en el crecimiento, la recidiva o el potencial metastásico de tumores que comprenden o muestran características neuroendocrinas o determinantes fenotípicos. Para los fines de la presente invención, tales tumores comprenderán tumores neuroendocrinos y tumores pseudoneuroendocrinos. La inter-
55 vención en la proliferación de tales células tumorígenas utilizando los nuevos conjugados de DLL3 descritos en el presente documento, puede mejorar o tratar de este modo un trastorno mediante más de un mecanismo (por ejemplo, la reducción de células iniciadoras de tumores y la interrupción de la señalización de la ruta oncogénica) para proporcionar efectos aditivos o sinérgicos. Todavía otras realizaciones preferidas pueden aprovechar la internalización celular de la proteína DLL3 de la superficie celular para administrar el agente anticancerígeno fijado. A este

respecto, se apreciará que la presente descripción no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, sino que incluye el uso amplio de los moduladores descritos para tratar trastornos asociados con DLL3 (incluyendo diversas neoplasias).

5 En todavía otras realizaciones preferidas, los moduladores se asociarán o se unirán a un epítipo, una porción, un motivo o un dominio específico de DLL3. Como se explicará con más detalle a continuación, ambas isoformas de DLL3 incorporan una región extracelular idéntica (véase la FIG. 2) que comprende al menos un dominio N-terminal, un dominio DSL (Delta/Serrate/lag-2) y seis dominios de tipo EGF (es decir, EGF1 - EGF6). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los moduladores se unirán o se asociarán con el dominio N-terminal de DLL3 (es decir, los aminoácidos 27-175 en la proteína madura), mientras que en otras realizaciones seleccionadas los moduladores se asociarán con el dominio DSL (es decir, los aminoácidos 176-215 de DLL3) o un epítipo en el mismo. Otros aspectos de la presente descripción comprenden anticuerpos que se asocian o se unen a un epítipo específico ubicado en un dominio particular de tipo EGF de DLL3. A este respecto, el modulador particular se puede asociar o unirse a un epítipo localizado en EGF1 (aminoácidos 216-249), EGF2 (aminoácidos 274-310), EGF3 (aminoácidos 312-351), EGF4 (aminoácidos 353-389), EGF5 (aminoácidos 391-427) o EGF6 (aminoácidos 429-465). Por supuesto, se apreciará que cada uno de los dominios mencionados anteriormente puede comprender más de un epítipo y/o más de una agrupación. En casos particularmente preferidos, la descripción comprenderá un anticuerpo que se une, reacciona o se asocia con el dominio DSL o un epítipo en el mismo. En otros casos preferidos, la descripción comprenderá anticuerpos que se unen, reaccionan o se asocian con un dominio de tipo EGF particular o un epítipo en el mismo. En todavía otras realizaciones preferidas, los moduladores se unirán, reaccionarán o se asociarán con el dominio N-terminal o un epítipo en el mismo.

Con respecto a las "agrupaciones" (del inglés, "bin") de moduladores o anticuerpos, se apreciará que el antígeno DLL3 puede analizarse o cartografiarse a través de la unión competitiva de anticuerpos, usando métodos reconocidos en la técnica para definir agrupaciones específicas ubicadas en o a lo largo de la proteína. Aunque se analiza con más detalle en el presente documento y se muestra en los Ejemplos a continuación, dos anticuerpos (uno de los cuales se puede denominar "anticuerpo de referencia", "anticuerpo de delimitación de agrupación" o "anticuerpo de delimitación") se pueden considerar que están en la misma agrupación si compiten entre sí por la unión al antígeno diana. En tales casos, los epítopos de los anticuerpos en cuestión pueden ser idénticos, sustancialmente idénticos o lo suficientemente cercanos (ya sea en un sentido lineal cuando están separados por unos pocos aminoácidos o de forma conformacional), de modo que ambos anticuerpos están inhibidos estéricamente o electrostáticamente o se les impide unirse al antígeno. Tales agrupaciones definidas se pueden asociar generalmente con ciertos dominios de DLL3 (por ejemplo, el anticuerpo de referencia se unirá con un epítipo contenido en un dominio específico) aunque la correlación no siempre es precisa (por ejemplo, puede haber más de una agrupación en un dominio o la agrupación se puede definir conformacionalmente y comprende más de un dominio). Se apreciará que los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la relación entre los dominios de DLL3 y las agrupaciones determinadas empíricamente.

Con respecto a la presente invención, un análisis de unión competitiva usando métodos reconocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA, resonancia de plasmón de superficie o interferometría de bio-cap) definía al menos nueve agrupaciones distintas, cada una de las cuales contenía varios moduladores de anticuerpos. Para los fines de la presente descripción, las nueve agrupaciones se denominaron bin A a bin I. Por tanto, en casos seleccionados, la presente descripción comprenderá un conjugado de anticuerpo y fármaco de los ADCs 1 - 5 que reside en una agrupación seleccionada a partir del grupo que consiste en bin A, bin B, bin C, bin D, bin E, bin F, bin G, bin H y bin I.

En otras realizaciones, los conjugados de la presente invención comprenden un anticuerpo que reside en una agrupación definida por un anticuerpo de referencia seleccionado a partir del grupo que consiste en SC16,3, SC16,4, SC16,5, SC16,7, SC16,8, SC16,10, SC16,11, SC16,13, SC16,15, SC16,18, SC16,19, SC16,20, SC16,21, SC16,22, SC16,23, SC16,25, SC16,26, SC16,29, SC16,30, SC16,31, SC16,34, SC16,35, SC16,36, SC16,38, SC16,41, SC16,42, SC16,45, SC16,47, SC16,49, SC16,50, SC16,52, SC16,55, SC16,56, SC16,57, SC16,58, SC16,61, SC16,62, SC16,63, SC16,65, SC16,67, SC16,68, SC16,72, SC16,73, SC16,78, SC16,79, SC16,80, SC16,81, SC16,84, SC16,88, SC16,101, SC16,103, SC16,104, SC16,105, SC16,106, SC16,107, SC16,108, SC16,109, SC16,110, SC16,111, SC16,113, SC16,114, SC16,115, SC16,116, SC16,117, SC16,118, SC16,120, SC16,121, SC16,122, SC16,123, SC16,124, SC16,125, SC16,126, SC16,129, SC16,130, SC16,131, SC16,132, SC16,133, SC16,134, SC16,135, SC16,136, SC16,137, SC16,138, SC16,139, SC16,140, SC16,141, SC16,142, SC16,143, SC16,144, SC16,147, SC16,148, SC16,149 y SC16,150. En aún otras realizaciones, los ADCs de la invención comprenderán anticuerpos de bin A, anticuerpos de bin B, anticuerpos de bin C, anticuerpos de bin D, anticuerpos de bin E, anticuerpos de bin F, anticuerpos de bin G, anticuerpos de bin H o anticuerpos de bin I. Todavía, otras realizaciones preferidas comprenderán un modulador de un anticuerpo de referencia y cualquier anticuerpo que compita con el anticuerpo de referencia.

El término "competir" o "anticuerpo competidor" cuando se usa en el contexto de los moduladores descritos, significa competencia en la unión entre anticuerpos según lo determinado por un ensayo en el que un anticuerpo de referencia o un fragmento inmunológicamente funcional previene o inhibe sustancialmente (por ejemplo, más del 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90%) de la unión específica de un anticuerpo del ensayo con un antígeno común. Los métodos compatibles para determinar esa competencia comprenden métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, interferometría de bio-cap, resonancia de plasmón de superficie, citome-

tría de flujo, ELISA competitivo, etc.

La presente descripción también proporciona kits o dispositivos y métodos asociados que emplean los conjugados de DLL3 descritos en el presente documento, y composiciones farmacéuticas de los conjugados de DLL3 como se describen en el presente documento, que son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con DLL3, tales como el cáncer. Para este fin, la presente descripción proporciona preferiblemente un artículo manufacturado útil para tratar trastornos asociados con DLL3 que comprende un receptáculo que contiene un conjugado de anticuerpo y fármaco de los ADCs 1 - 5 y materiales con instrucciones para usar los conjugados para tratar, mejorar o prevenir un trastorno asociado a DLL3 o una progresión o una recidiva del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 proporciona una alineación de secuencias de las dos isoformas de la proteína DLL3 (SEQ ID NOS: 1 y 2).

La FIG. 2 proporciona una representación esquemática de la región extracelular de la proteína DLL3 que ilustra las posiciones de los diversos dominios.

Las FIGS. 3A y 3B proporcionan, en forma tabular, secuencias de aminoácidos contiguas (SEQ ID NOS: 21-407, números impares) de regiones variables de cadena ligera y pesada de una serie de anticuerpos de DLL3 ejemplares humanizados y murinos compatibles con los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos de forma aislada, clonada y modificada genéticamente según se describe en los Ejemplos de este documento.

La FIG. 4 representa, en forma esquemática, los resultados del análisis de cartografiado a nivel de dominio de moduladores de DLL3 ejemplares aislados, clonados y modificados genéticamente como se describe en los Ejemplos de este documento.

La FIG. 5 indica las propiedades bioquímicas e inmunológicas de moduladores de DLL3 ejemplares representados en un formato tabular.

La FIG. 6 proporciona una lista de conjugados de anticuerpo y fármaco ejemplares generados según la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Introducción

Los encabezados de las secciones que se usan en este documento, son solo para fines de organización y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita. Finalmente, para los fines de la presente descripción, todos los números de registro de secuencias identificadoras se pueden encontrar en la base de datos de Secuencias de Referencia (RefSeq) del NCBI y/o en la base de datos de secuencias de archivo del GenBank® del NCBI, a menos que se indique lo contrario.

Como se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que los determinantes fenotípicos de DLL3 están asociados clínicamente con varios trastornos proliferativos, incluyendo neoplasia que presenta características neuroendocrinas, y que la proteína DLL3 y sus variantes o isoformas proporcionan marcadores tumorales útiles que se pueden explotar en el tratamiento de enfermedades relacionadas. A este respecto, la presente descripción proporciona una serie de conjugados de anticuerpo y fármaco establecidos como los ADCs 1 - 5 anteriores, que comprenden un agente de direccionamiento de anticuerpos anti-DLL3 y una carga útil de PBD. Como se describe con más detalle a continuación y se expone en los Ejemplos adjuntos, los ADCs de DLL3 descritos son particularmente eficaces para eliminar células tumorígenas y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento y la profilaxis de ciertos trastornos proliferativos o la progresión o recidiva de los mismos.

Además, como se muestra en la presente solicitud, se ha encontrado que los marcadores o los determinantes de DLL3, como la proteína DLL3 de la superficie celular, están asociados terapéuticamente con las células madre del cáncer (también conocidas como células que perpetúan tumores) y se pueden explotar de manera efectiva para eliminarlas o silenciarlas. La capacidad para reducir o eliminar selectivamente las células madre del cáncer mediante el uso de moduladores de DLL3 conjugados como se describe en el presente documento, es sorprendente porque se sabe que esas células son generalmente resistentes a muchos tratamientos convencionales. Es decir, la efectividad de los métodos de tratamiento tradicionales, así como los más recientes dirigidos, está limitada frecuentemente por la existencia y/o la aparición de células madre del cáncer, resistentes que son capaces de perpetuar el crecimiento del tumor, incluso frente a esos diversos métodos de tratamiento. Además, los determinantes asociados con las células madre del cáncer, a menudo ofrecen dianas terapéuticas deficientes debido a una expresión baja o inconsistente, una incapacidad de permanecer asociados a la célula tumorígena o un fallo en la presentación en la superficie celular. En claro contraste con las enseñanzas de la técnica anterior, los conjugados de anticuerpo y fármaco y los métodos descritos de forma inmediata, superan de manera efectiva esa resistencia inherente y eliminan, agotan, silencian o promueven específicamente la diferenciación de tales células madre cancerosas, anulando de este modo su capacidad para sostener o volver a inducir el crecimiento del tumor subyacente. Además, como la

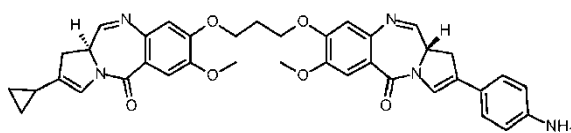
expresión de la proteína DLL3 se ha asociado en gran medida con ubicaciones intracelulares como en el Golgi, era incierto que tales determinantes fenotípicos se pudieran explotar con éxito como una diana terapéutica para los ADCs específicos, como se describe en este documento.

5 Por lo tanto, es particularmente notable que los conjugados de DLL3, como los que se describen en el presente documento, puedan usarse ventajosamente en el tratamiento y/o la prevención de trastornos proliferativos seleccionados (por ejemplo, neoplásicos) o la progresión o recidiva de los mismos. Se apreciará que, aunque los casos preferidos de la descripción se expondrán ampliamente a continuación, particularmente en términos de dominios, regiones o epítomos particulares, o en el contexto de células madre cancerosas o tumores que comprenden características neuroendocrinas y sus interacciones con los conjugados de anticuerpo y fármaco descritos, los expertos en la materia apreciarán que la presente descripción no está limitada por tales casos a modo de ejemplo. Más bien, los casos más expansivos de la presente descripción se dirigen amplia y expresamente a los conjugados de DLL3 descritos y a su uso en el tratamiento y/o la prevención de una variedad de trastornos asociados o mediados por DLL3, incluyendo los trastornos neoplásicos o de proliferación celular, independientemente de cualquier mecanismo de acción particular o componente específico tumoral, celular o molecular.

15 Para ese fin, y como se demuestra en la presente solicitud, se ha encontrado inesperadamente que los conjugados de DLL3 descritos se pueden usar eficazmente para dirigirse y eliminar o incapacitar de otra manera células proliferativas o tumorígenas y para tratar trastornos asociados con DLL3 (por ejemplo, la neoplasia). Tal y como se usa en este documento, un "trastorno asociado con DLL3" se considerará que incluye cualquier trastorno o enfermedad (incluidos los trastornos proliferativos) que está marcado, diagnosticado, detectado o identificado por una aberración fenotípica o una expresión de los componentes genéticos de DLL3 ("determinante de DLL3") durante el curso o la etiología de la enfermedad o trastorno. A este respecto, una aberración o determinante fenotípico de DLL3 puede comprender, por ejemplo, niveles elevados o reducidos de expresión de la proteína DLL3, una expresión anormal de la proteína DLL3 en ciertas poblaciones de células definibles o una expresión anormal de la proteína DLL3 en una fase o etapa inapropiada del ciclo de vida de una célula. Por supuesto, se apreciará que patrones de expresión similares de determinantes genotípicos (por ejemplo, niveles de transcripción de ARNm) de DLL3 también se pueden usar para clasificar, detectar o tratar trastornos de DLL3.

30 Con respecto a los conjugados descritos, la presente descripción proporciona dímeros de PBD con un enlazador conectado a una posición en uno de los restos de PBD y conjugados a través del enlazador con un modulador de anticuerpo de DLL3. A través de estas configuraciones diseñadas cuidadosamente, el conjugado permite la liberación de un compuesto de PBD activo que preferiblemente no conserva ninguna parte del enlazador. Es decir, no hay ningún resto corto o residuo del enlazador presente que pueda afectar adversamente a la reactividad de la carga útil de la PBD. De este modo, los conjugados de DLL3 descritos liberan los siguientes compuestos de PBD dímeros después de la escisión del enlazador.

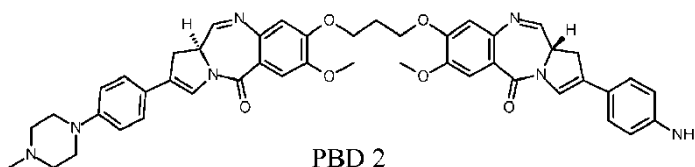
Un conjugado de ADC 1 libera el compuesto PBD 1:



PBD 1

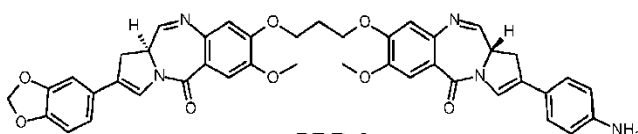
35

Un conjugado de ADC 2 libera el compuesto PBD 2:



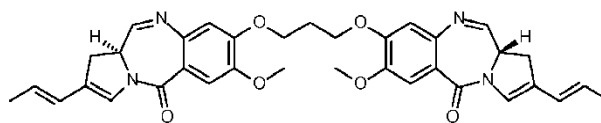
PBD 2

Un conjugado de ADC 3 libera el compuesto PBD 3:



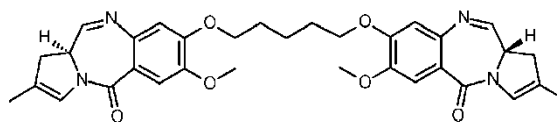
PBD 3

40 Un conjugado de ADC 4 libera el compuesto PBD 4:



PBD 4

Un conjugado de ADC 5 libera el compuesto PBD 5:



PBD 5

- 5 Por consiguiente, el suministro de los compuestos tóxicos de PBD 1, PBD 2, PBD 3, PBD 4 o PBD 5 se logra en el sitio de activación deseado (es decir, dentro de una célula tumorigena) mediante los ADCs 1 - 5 a través de la acción de una enzima, tal como catepsina, en el grupo enlazador, y en particular en el resto dipéptido valina-alanina incorporado. Tal y como se describe con más detalle a continuación, la administración localizada de las citotoxinas de PBD descritas puede proporcionar una eliminación efectiva de varios tipos de células tumorigenas con una toxicidad sustancialmente menor que la asociada con las quimioterapias con un patrón de tratamiento no dirigido.
- 10 A este respecto, un aspecto de la descripción comprende la administración de un compuesto seleccionado a partir del grupo que consiste en PBD 1, PBD 2, PBD 3, PBD 4 y PBD 5 que comprende la etapa de administrar un conjugado de DLL3.

II. Fisiología de DLL3

- 15 La vía de señalización de Notch, identificada por primera vez en *C. elegans* y *Drosophila* y que posteriormente se demostró que se conserva evolutivamente desde invertebrados a vertebrados, participa en una serie de procesos biológicos fundamentales que incluyen el desarrollo embrionario normal, la homeostasis del tejido adulto y el mantenimiento de las células madre (D'Souza et al., 2010; Liu et al., 2010). La señalización de Notch es decisiva para una variedad de tipos de células durante la especificación, la diferenciación y la morfogénesis. Con frecuencia, esto ocurre a través del mecanismo de inhibición lateral, en el que las células que expresan el(los) ligando(s) de Notch adoptan un destino celular predeterminado, pero suprimen ese destino en las células adyacentes mediante la estimulación de la señalización de Notch (Sternberg, 1988, Cabrera 1990). Se ha descubierto que esta elección de destino celular binario mediado por la señalización de Notch, desempeña una función en numerosos tejidos, incluido el sistema nervioso en desarrollo (de la Pompa et al., 1997), los sistemas hematopoyético e inmune (Bigas y Espinosa, 2012; Hoyne et al., 2011; Nagase et al., 2011), el intestino (Fre et al., 2005; Fre et al., 2009), el páncreas endocrino (Apelqvist et al., 1999; Jensen et al., 2000), la pituitaria (Raetzman et al., 2004) y el sistema neuroendocrino difuso (Ito et al., 2000; Schonhoff et al., 2004). Un mecanismo generalizado para implementar ese cambio binario parece estar conservado a pesar de la amplia gama de sistemas de desarrollo en los que Notch desempeña una función; por ejemplo, en las células en donde la elección del destino celular predeterminado está determinada por reguladores de la transcripción conocidos, tales como proteínas de hélice-bucle-hélice básicas (bHLH), la señalización de Notch conduce a una activación de una clase de genes sensibles a Notch, que a su vez suprimen la actividad de las proteínas bHLH (Ball, 2004). Estas decisiones binarias tienen lugar en el contexto más amplio de señales de desarrollo y señalización que permiten que la señalización de Notch efectúe una proliferación o la inhiba, y desencadene una autorrenovación o la inhiba.

- 35 En *Drosophila*, la señalización de Notch está mediada principalmente por un gen del receptor Notch y dos genes de ligandos, conocidos como Serrate y Delta (Wharton et al., 1985; Rebay et al., 1991). En los seres humanos, hay cuatro receptores Notch y cinco ligandos DSL (Delta-Serrate LAG2) conocidos - dos homólogos de Serrate, conocidos como Jagged1 y Jagged 2, y tres homólogos de Delta, denominados ligandos de tipo delta o DLL1, DLL3 y DLL4. En general, los receptores Notch en la superficie de la célula receptora de señales se activan mediante interacciones con ligandos expresados en la superficie de una célula opuesta, emisora de señales (denominada interacción trans). Estas interacciones trans conducen a una secuencia de escisiones mediadas por proteasas del receptor Notch. En consecuencia, el dominio intracelular del receptor Notch se puede traslocar desde la membrana al núcleo, en donde se asocia con la familia CSL de factores de transcripción (RBPJ en humanos) y los convierte de represores transcripcionales a activadores de genes sensibles a Notch.

- 45 De los ligandos de Notch humanos, DLL3 es diferente porque parece incapaz de activar el receptor Notch mediante interacciones trans (Ladi et al., 2005). Los ligandos de Notch también pueden interactuar con receptores Notch en cis (en la misma célula) lo que conduce a una inhibición de la señal de Notch, aunque los mecanismos exactos de la inhibición en cis no están claros y pueden variar dependiendo del ligando (por ejemplo, véase Klein et al., 1997; Ladi et al., 2005; Glittenberg et al., 2006). Dos modos hipotéticos de inhibición incluyen la modulación de la señalización de Notch en la superficie celular evitando las interacciones trans, o mediante una reducción de la cantidad de receptor Notch en la superficie de la célula alterando el procesamiento del receptor o provocando una retención física del receptor en el retículo endoplásmico o el Golgi (Sakamoto et al., 2002; Dunwoodie, 2009). Sin embargo, está claro

que las diferencias estocásticas en la expresión de los receptores Notch y los ligandos en las células vecinas, se pueden amplificar a través de procesos tanto transcripcionales como no transcripcionales, y equilibrios sutiles de las interacciones en cis y trans pueden dar lugar a un ajuste fino de la delimitación mediada por Notch de destinos celulares divergentes en tejidos vecinos (Sprinzak et al., 2010).

5 DLL3 (también conocido como tipo Delta 3 o SCDO1) es un miembro de la familia de tipo Delta de ligandos DSL de Notch. Los ortólogos de proteínas DLL3 representativos incluyen, pero que no están limitados a, ser humano (nº de registro NP_058637 y NP_982353), chimpancé (nº de registro XP_003316395), ratón (nº de registro NP_031892) y rata (nº de registro NP_446118). En los seres humanos, el gen DLL3 consiste en 8 exones que incluyen 9,5 kpb ubicados en el cromosoma 19q13. Un corte y empalme alternativo dentro del último exón da lugar a dos transcritos procesados, uno de 2389 bases (nº de registro NM_016941) y uno de 2052 bases (nº de registro NM_203486). El primer transcrito codifica una proteína de 618 aminoácidos (nº de registro NP_058637; FIG. 1, SEQ ID NO: 1), mientras que el último codifica una proteína de 587 aminoácidos (nº de registro NP_982353; FIG. 1, SEQ ID NO: 2). Estas dos isoformas de proteína de DLL3 comparten una identidad total del 100% en sus dominios extracelulares y sus dominios de transmembrana, diferenciándose únicamente en que la isoforma más larga contiene una cola citoplásmica extendida que contiene 32 residuos adicionales en el extremo carboxi de la proteína (FIG. 1). La relevancia biológica de las isoformas no está clara, aunque ambas isoformas pueden detectarse en células tumorales.

En general, los ligandos DSL están compuestos por una serie de dominios estructurales: un dominio N-terminal único, seguido de un dominio DSL conservado, repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) en tándem, un dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico no muy conservado a través de los ligandos, pero uno que contiene múltiples residuos de lisina que son sitios potenciales para la ubiquitinación mediante ligasas de ubiquitina E3 únicas. El dominio DSL es un dominio EGF degenerado que es necesario pero no suficiente para las interacciones con los receptores Notch (Shimizu et al., 1999). Además, las dos primeras repeticiones de tipo EGF de la mayoría de los ligandos DSL, contienen un motivo de secuencia proteica más pequeño conocido como dominio DOS que interacciona de forma cooperativa con el dominio DSL cuando se activa la señalización de Notch.

La FIG. 2 proporciona un diagrama esquemático de la región extracelular de la proteína DLL3, que ilustra la yuxtaposición general de los seis dominios de tipo EGF, el único dominio DSL y el dominio N-terminal. En general, se reconoce que los dominios EGF aparecen en aproximadamente los residuos de aminoácidos 216-249 (dominio 1), 274-310 (dominio 2), 312-351 (dominio 3), 353-389 (dominio 4), 391-427 (dominio 5) y 429-465 (dominio 6), con el dominio DSL en aproximadamente los residuos de aminoácidos 176-215 y el dominio N-terminal en aproximadamente los residuos de aminoácidos 27-175 de hDLL3 (SEQ ID NO: 1 y 2). Como se describe con más detalle en este documento y se muestra en los Ejemplos a continuación, cada uno de los dominios de tipo EGF, el dominio DSL y el dominio N-terminal comprenden parte de la proteína DLL3 tal como se define por una secuencia de aminoácidos distinta. Se debe tener en cuenta que, para los fines de la presente descripción, los respectivos dominios de tipo EGF se pueden denominar EGF1 a EGF6, siendo EGF1 el más cercano a la porción N-terminal de la proteína. Con respecto a la composición estructural de la proteína, un aspecto significativo de la presente descripción es que los moduladores de DLL3 descritos pueden generarse, producirse, modificarse genéticamente o seleccionarse para que reaccionen con un dominio, un motivo o un epítopo seleccionado. En ciertos casos, esos moduladores específicos del sitio pueden proporcionar una mayor reactividad y/o eficacia dependiendo de su modo de acción principal.

Se debe tener en cuenta que, tal y como se usa en el presente documento, las expresiones "proteína madura" o "polipéptido maduro", tal y como se usan en el presente documento, se refieren a la(s) forma(s) de la proteína producida mediante expresión en una célula de mamífero. En general, se plantea la hipótesis de que una vez que se ha iniciado la exportación de una cadena proteica en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso, las proteínas secretadas por las células de mamífero tienen una secuencia de péptido señal (SP) que se escinde del polipéptido completo para producir una forma "madura" de la proteína. En ambas isoformas de DLL3, la proteína madura comprende un péptido señal de 26 aminoácidos que puede recortarse antes de la expresión en la superficie celular. Por lo tanto, en las proteínas maduras, el dominio N-terminal se extenderá desde la posición 27 en la proteína hasta el comienzo del dominio DSL. Por supuesto, si la proteína no se procesa de esta manera, el dominio N-terminal se mantendría para extenderse a la posición uno de SEQ ID NOS: 1 y 2.

De los diversos ligandos de tipo Delta, DLL3 es el más divergente de los otros en la familia, ya que contiene un dominio DSL degenerado, sin motivos DOS y un dominio intracelular que carece de residuos de lisina. El DSL degenerado y la falta de motivos DOS son consistentes con la incapacidad de DLL3 para activar la señalización de Notch en trans (entre células), lo que sugiere que DLL3, a diferencia de DLL1 o DLL4, actúa solo como un inhibidor de la señalización de Notch (Ladi et al., 2005). Los estudios han mostrado que DLL3 puede residir principalmente en el Golgi in cis (Geffers et al., 2007), lo que sería coherente con la capacidad hipotética de retener el receptor Notch intracelularmente, o de interferir en el procesamiento de los receptores Notch, impidiendo la exportación a la superficie de la célula y, en cambio, reorientándolo al lisosoma (Chapman et al., 2011). Sin embargo, algunas proteínas DLL3 pueden aparecer en la superficie celular cuando la proteína se sobreexpresa artificialmente en sistemas modelo (Ladi et al., 2005), pero no es obvio que eso sea el caso en contextos biológicos normales, ni en tumores en los que el transcrito de ARNm de DLL3 es elevado; de manera algo sorprendente, los niveles de proteína detectados en los tipos de tumores descritos en el presente documento indican que la proteína DLL3 significativa está escapando a la superficie celular de varios tumores.

Además, como se ha mencionado anteriormente, la señalización de Notch desempeña un papel en el desarrollo y el mantenimiento de las células neuroendocrinas y tumores que presentan características neuroendocrinas. En este sentido, la señalización de Notch está involucrada en una amplia gama de decisiones sobre el destino celular en los órganos endocrinos normales y en el sistema neuroendocrino difuso. Por ejemplo, en el páncreas, se requiere la señalización de Notch para suprimir el desarrollo de un fenotipo endocrino por defecto, mediado por el factor de transcripción de bHLH, NGN3 (Habener et al., 2005). Una supresión similar mediada por Notch del destino de células endocrinas ocurre en las células enteroendocrinas (Schönhoff et al., 2004), las células parafoliculares tiroideas (Cook et al., 2010), al especificar las proporciones relativas de tipos de células neuroendocrinas en la pituitaria (Dutta et al., 2011), y es probable que esté involucrada en decisiones de células dentro de los pulmones para adoptar un fenotipo neuroendocrino o no neuroendocrino (Chen et al., 1997; Ito et al., 2000; Sriuranpong et al., 2002). Por lo tanto, está claro que en muchos tejidos, la supresión de la señalización de Notch está ligada a los fenotipos neuroendocrinos.

Una reactivación inadecuada de las vías de señalización del desarrollo o la desregulación de las vías de señalización normales se observan comúnmente en los tumores, y en el caso de la señalización de Notch, se han asociado con numerosos tipos de tumores (Koch y Radtke, 2010; Harris et al., 2012). La vía de Notch se ha estudiado como un oncogén en el cáncer de pulmón, colorrectal, pancreático y algunos tipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (véase Zarenczan y Chen, 2010 y sus referencias). En contraste, se ha notificado que Notch actúa como un supresor tumoral en tumores con características neuroendocrinas (véase Zarenczan y Chen, 2010 *supra*). Los tumores con características neuroendocrinas surgen con poca frecuencia en una amplia gama de sitios primarios, y si bien su clasificación exhaustiva sigue siendo problemática (Yao et al., 2008; Klimstra et al., 2010; Kloppel, 2011), pueden clasificarse en cuatro tipos principales: carcinoides benignos de bajo grado, tumores neuroendocrinos bien diferenciados de bajo grado con comportamiento maligno, tumores con características neuroendocrinas y epiteliales mixtas y carcinomas neuroendocrinos poco diferenciados de alto grado. De estas clasificaciones, los carcinomas neuroendocrinos poco diferenciados, que incluyen el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y los subconjuntos del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), son tipos de cáncer con pronósticos sombríos. Se ha postulado que el SCLC es de origen broncogénico y se debe en parte a las células neuroendocrinas pulmonares (Galluzzo y Bocchetta, 2011). Cualquiera que sea la fuente de origen celular específica para cada uno de estos tumores que poseen un fenotipo neuroendocrino, se puede esperar que la supresión de la señalización de Notch, ya sea por lesiones directas en los propios genes de la vía de Notch, o por la activación de otros genes que suprimen la señalización de Notch, conduzca a la adquisición del fenotipo neuroendocrino de estos tumores. Por extensión, los genes que conducen a la alteración de la vía de Notch pueden ofrecer dianas terapéuticas para el tratamiento de tumores con fenotipos neuroendocrinos, en particular para indicaciones que actualmente tienen resultados clínicos deficientes.

ASCL1 es uno de esos genes que parece interactuar con la vía de señalización de Notch a través de DLL3. Está claro que muchos tumores neuroendocrinos muestran un fenotipo endocrino poco diferenciado (es decir, parcialmente completo); por ejemplo, una elevación o una expresión marcada de varias proteínas y polipéptidos endocrinos (por ejemplo, cromogranina A, CHGA; calcitonina, CALCA; propiomelanocorina, POMC; somatostatina, SST), proteínas asociadas con vesículas secretoras (por ejemplo, sinaptofisina, SYP) y genes involucrados en las rutas bioquímicas responsables de la síntesis de aminas bioactivas (p. ej., dopa descarboxilasa, DDC). Quizás no sorprendentemente, estos tumores frecuentemente sobreexpresan ASCL1 (también conocido como mASH1 en ratones, o hASH1 en humanos), un factor de transcripción conocido por desempeñar un papel en la organización de cascadas génicas que conducen a fenotipos neurales y neuroendocrinos. Aunque los detalles moleculares específicos de la cascada siguen estando mal definidos, está cada vez más claro que para ciertos tipos de células, en particular las células parafoliculares tiroideas (Kameda et al., 2007), las células cromafines de la médula suprarrenal (Huber et al., 2002) y las células que se encuentran en el sistema neuroendocrino difuso del pulmón (Chen et al., 1997; Ito et al., 2000; Sriuranpong et al., 2002), ASCL1 forma parte de un bucle regulador del desarrollo perfectamente sintonizado en el que las opciones de destino celular están mediadas por el equilibrio de las cascadas de expresión génica mediadas por ASCL1 y por Notch. Por ejemplo, se encontró que ASCL1 se expresaba en células neuroendocrinas pulmonares normales de ratón, mientras que el efector de señalización de Notch, HES1, se expresaba en células pulmonares no neuroendocrinas (Ito et al., 2000). Que estas dos cascadas estén en un fino equilibrio con una posible regulación cruzada, se aprecia cada vez más. Se ha mostrado que el efector de Notch HES1 regula a la baja la expresión de ASCL1 (Chen et al., 1997; Sriuranpong et al., 2002). Estos resultados demuestran claramente que la señalización de Notch puede suprimir la diferenciación neuroendocrina. Sin embargo, una demostración de que ASCL1 unido al promotor DLL3 activa la expresión de DLL3 (Henke et al., 2009) y la observación de que DLL3 atenúa la señalización de Notch (Ladi et al., 2005), cierra el circuito genético para las opciones de destino celular entre fenotipos neuroendocrinos y no neuroendocrinos.

Dado que la señalización de Notch parece haber evolucionado para amplificar las diferencias sutiles entre las células vecinas para permitir dominios tisulares fuertemente unidos con rutas de diferenciación divergentes (p. ej., "inhibición lateral", como se ha descrito anteriormente), estos datos en conjunto sugieren que un bucle regulador del desarrollo finamente sintonizado se ha reactivado y desregulado en los cánceres con fenotipos neuroendocrinos. Si bien no es obvio que DLL3 pueda proporcionar una diana adecuada en la superficie celular para el desarrollo de terapias con anticuerpos, dada su residencia normal dentro de los compartimentos membranosos interiores de la célula (Geffers et al., 2007) y sus presuntas interacciones ahí con Notch, es posible que la elevación resultante de la expresión de

DLL3 en los tumores neuroendocrinos pueda ofrecer una diana terapéutica única para los tumores con fenotipo neuroendocrino (por ejemplo, NETs y pNETs). Comúnmente se ha observado que una gran sobreexpresión de proteínas en sistemas de laboratorio puede causar una localización errónea de la proteína sobreexpresada dentro de la célula. Por lo tanto, es una hipótesis razonable, pero todavía no es obvia sin una verificación experimental, que la sobreexpresión de DLL3 en los tumores puede conducir a alguna expresión de la proteína en la superficie celular y, por lo tanto, a presentar una diana para los ADCs descritos de la presente descripción.

III. Células madre del cáncer

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto sorprendentemente que la expresión aberrante de DLL3 (genotípica y/o fenotípica) está asociada con varias subpoblaciones de células tumorígenas. A este respecto, la presente descripción proporciona conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco que pueden ser particularmente útiles para dirigirse a esas células (por ejemplo, células madre cancerosas), facilitando de ese modo el tratamiento, el control o la prevención de trastornos neoplásicos. Por lo tanto, en casos preferidos, los ADCs de DLL3 descritos se pueden usar ventajosamente para reducir la frecuencia de células iniciadoras de tumores de acuerdo con las presentes enseñanzas y facilitar de este modo el tratamiento o el control de trastornos proliferativos.

Para los fines de la presente solicitud, la expresión "célula iniciadora de tumor" (TIC) incluye tanto "células que perpetúan el tumor" (TPC; es decir, células madre cancerosas o CSC) como "células progenitoras de tumor" altamente proliferativas (denominadas TProg), que juntas generalmente comprenden una subpoblación única (es decir, 0,1-40%) de una masa tumoral o masa. Para los fines de la presente descripción, las expresiones "células que perpetúan el tumor" y "células madre cancerosas" o "células madre neoplásicas" son equivalentes y se pueden usar indistintamente en este documento. Las TPC difieren de las TProg en que las TPC pueden repetir completamente la composición de las células tumorales existentes dentro de un tumor y tener una capacidad ilimitada de autorrenovación, como se demuestra por el trasplante en serie (dos o más pases a través de ratones) de pocas cantidades de células aisladas, mientras que las TProg no mostrarán una capacidad ilimitada de autorrenovación.

Los expertos en la materia apreciarán que la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando marcadores apropiados de la superficie celular es un método fiable para aislar subpoblaciones de células madre de cáncer altamente enriquecidas (por ejemplo, >99,5% de pureza) debido, al menos en parte, a su capacidad para discriminar entre células individuales y agrupaciones de células (es decir, dobletes, etc.). Utilizando tales técnicas, se ha mostrado que cuando se trasplantan pocas células TProg muy purificadas en ratones inmunocomprometidos, pueden estimular el crecimiento del tumor en un trasplante primario. Sin embargo, a diferencia de las subpoblaciones de TPC purificadas, los tumores generados por TProg no reflejan completamente el tumor parental en la heterogeneidad celular fenotípica y son demostrablemente ineficientes para reiniciar una tumorigénesis en serie en los trasplantes subsiguientes. En contraste, las subpoblaciones de células madre del cáncer reconstituyen completamente la heterogeneidad celular de los tumores parentales y pueden iniciar tumores de manera eficaz cuando se aíslan y trasplantan en serie. Por lo tanto, los expertos en la técnica reconocerán que una diferencia definitiva entre las TPC y TProg, aunque ambas pueden ser generadoras de tumores en trasplantes primarios, es la capacidad única de las TPC para alimentar perpetuamente un crecimiento tumoral heterogéneo después de un trasplante en serie con un número bajo de células. Otros enfoques comunes para caracterizar las TPC incluyen la morfología y el examen de marcadores de la superficie celular, el perfil transcripcional y la respuesta a fármacos, aunque la expresión del marcador puede cambiar con las condiciones del cultivo y con los pases de la línea celular *in vitro*.

Por consiguiente, para los fines de la presente invención, las células que perpetúan un tumor, tales como las células madre normales que mantienen jerarquías celulares en el tejido normal, se definen preferiblemente por su capacidad para autorrenovarse indefinidamente mientras que conservan la capacidad de diferenciación multilínea. Las células que perpetúan un tumor son, por lo tanto, capaces de generar tanto una progenie tumorígena (es decir, células iniciadoras de tumor: TPC y TProg) como una progenie no tumorígena (NTG). Tal y como se usa en este documento, una "célula no tumorígena" (NTG) se refiere a una célula tumoral que surge a partir de células iniciadoras de tumor, pero que no tiene ella misma la capacidad de autorrenovarse o de generar los linajes heterogéneos de células tumorales que comprenden un tumor. Experimentalmente, las células NTG son incapaces de formar tumores de forma reproducible en ratones, incluso cuando se trasplantan con cantidades de células en exceso.

Tal y como se ha indicado, las TProg también se clasifican como células iniciadoras de tumores (o TIC) debido a su capacidad limitada para generar tumores en ratones. Las TProg son una progenie de las TPC y normalmente son capaces de un número finito de divisiones celulares que no se renuevan por sí mismas. Además, las células TProg pueden dividirse en células progenitoras tumorales tempranas (ETP) y células progenitoras tumorales tardías (LTP), cada una de las cuales puede distinguirse por el fenotipo (por ejemplo, marcadores de la superficie celular) y diferentes capacidades para repetir la arquitectura de las células tumorales. A pesar de tales diferencias técnicas, tanto las ETP como las LTP difieren funcionalmente de las TPC en que en general son menos capaces de reconstituir tumores en serie cuando se trasplantan con un número bajo de células y, por lo general, no reflejan la heterogeneidad del tumor parental. A pesar de las distinciones anteriores, también se ha mostrado que varias poblaciones de TProg pueden, en raras ocasiones, ganar capacidades de autorrenovación normalmente atribuidas a las células madre y convertirse ellas mismas en TPC (o CSC). En cualquier caso, ambos tipos de células iniciadoras de tumores están probablemente representadas en la masa tumoral típica de un solo paciente y están sujetas a tratamiento con los moduladores como se describe en el presente documento. Es decir, las composiciones descritas son generalmente

eficaces para reducir la frecuencia o alterar la quimiosensibilidad de tales células iniciadoras de tumores positivas para DLL3, independientemente de la realización particular o la mezcla representada en un tumor.

5 En el contexto de la presente invención, las TPC son más tumorígenas, relativamente más inactivas y, a menudo, más quimiorresistentes que las TProg (tanto ETP como LTP), las células NTG y las células obtenidas a partir de no
10 TPC que se infiltran en tumores (p. ej., fibroblastos/estroma, células endoteliales & hematopoyéticas) que comprenden la masa de un tumor. Dado que las terapias y los regímenes convencionales, en gran parte, han sido diseñados para reducir la masa de los tumores y atacar a las células de proliferación rápida, es probable que las TPC sean más resistentes a las terapias y los regímenes convencionales que las TProg de proliferación más rápida y otras poblaciones de células de la masa tumoral. Además, las TPC a menudo expresan otras características que las hacen
15 relativamente quimiorresistentes a las terapias convencionales, como el aumento de la expresión de transportadores de resistencia a múltiples fármacos, mecanismos mejorados de reparación del ADN y proteínas antiapoptóticas. Estas propiedades, en donde cada una de las cuales contribuye a la tolerancia a los fármacos mediante TPC, constituyen una razón clave para el fracaso de los regímenes de tratamiento oncológico convencionales para asegurar un beneficio a largo plazo para la mayoría de los pacientes con neoplasia en estadio avanzado; es decir, la incapacidad para dirigirse y erradicar adecuadamente aquellas células que nutren el crecimiento continuado del tumor y la recidiva (es decir, TPC o CSC).

A diferencia de muchos tratamientos de la técnica anterior, los nuevos conjugados de anticuerpo y fármaco de la presente invención reducen preferiblemente la frecuencia de las células iniciadoras de tumores tras la administración a un sujeto del ADC. Como se ha señalado anteriormente, la reducción de la frecuencia de células iniciadoras de tumores puede tener lugar como resultado de a) la eliminación, la reducción, la sensibilización, el silenciamiento o la inhibición de las células iniciadoras de tumores; b) el control del crecimiento, la expansión o la recidiva de las células iniciadoras de tumores; c) la interrupción del inicio, la propagación, el mantenimiento o la proliferación de las células iniciadoras de tumores; o d) la obstaculización de otro modo de la supervivencia, la regeneración y/o la metástasis de las células tumorígenas. En algunas realizaciones, la reducción de la frecuencia de las células iniciadoras de tumores se produce como resultado de un cambio en una o varias rutas fisiológicas. El cambio en la ruta, ya sea por reducción o eliminación de las células iniciadoras del tumor o modificando su potencial (p. ej., diferenciación inducida, ruptura de nicho) o interfiriendo de otro modo en su capacidad para influir en el entorno del tumor u otras células, a su vez permite un tratamiento más eficaz de los trastornos asociados con DLL3 mediante una inhibición de la tumorigénesis, del mantenimiento del tumor y/o de la metástasis y la recidiva.

30 Entre los métodos reconocidos en la técnica que se pueden usar para evaluar una reducción de ese tipo en la frecuencia de las células iniciadoras de tumores, el análisis por dilución limitante *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente viene seguido por un cálculo utilizando las estadísticas de distribución de Poisson o evaluando la frecuencia de eventos definitivos predefinidos, como la capacidad para generar o no tumores *in vivo*. Si bien ese análisis por dilución limitante comprende métodos preferidos para calcular una reducción de la frecuencia celular del inicio de un tumor,
35 también se pueden usar otros métodos menos exigentes para determinar de manera efectiva los valores deseados, aunque con un poco menos precisión, y son totalmente compatibles con las enseñanzas de este documento. Por lo tanto, como apreciarán los expertos en la técnica, también es posible determinar la reducción de los valores de la frecuencia a través de medios de citometría de flujo o inmunohistoquímicos bien conocidos. En cuanto a todos los métodos mencionados anteriormente, véase, por ejemplo, Dylla et al. 2008, PMID: 18560594 y Hoey et al. 2009, PMID: 19664991.

Con respecto al análisis por dilución limitante, el cálculo *in vitro* de la frecuencia de células que inician un tumor se puede lograr depositando células tumorales humanas fraccionadas o no fraccionadas (por ejemplo, de tumores tratados y no tratados, respectivamente) en condiciones de crecimiento *in vitro* que favorecen la formación de colonias. De esta manera, las células formadoras de colonias se pueden calcular mediante un simple recuento y caracterización de las colonias, o mediante un análisis que consiste, por ejemplo, en el depósito de células tumorales humanas en placas en diluciones en serie y puntuando cada pocillo como positivo o negativo según la formación de colonias, al menos 10 días después extender en las placas. Los experimentos o análisis *in vivo* por dilución limitante, que generalmente son más precisos en su capacidad para determinar la frecuencia de células iniciadoras de tumor, incluyen el trasplante de células tumorales humanas, ya sea de poblaciones de control sin tratar o tratadas, por ejemplo, en ratones inmunocomprometidos en diluciones en serie y luego puntuar cada ratón como positivo o negativo según la formación de tumores al menos 60 días después del trasplante. La derivación de los valores de la frecuencia celular mediante el análisis por dilución limitante *in vitro* o *in vivo* se realiza preferiblemente mediante la aplicación de estadísticas de distribución de Poisson a la frecuencia conocida de eventos positivos y negativos, proporcionando de este modo una frecuencia para eventos que cumplen la definición de un evento positivo; en ese caso, la formación de colonias o tumores, respectivamente.

En cuanto a otros métodos compatibles con la presente invención que se pueden usar para calcular la frecuencia de células que inician un tumor, los más comunes comprenden técnicas de citometría de flujo cuantificables y procedimientos de tinción inmunohistoquímica. Aunque no son tan precisos como las técnicas de análisis por dilución limitante descritas inmediatamente antes, estos procedimientos son mucho menos laboriosos y proporcionan valores razonables en un marco de tiempo relativamente corto. Por lo tanto, se apreciará que un experto en la técnica puede usar la determinación del perfil de un marcador de superficie celular por citometría de flujo, empleando uno o varios anticuerpos o reactivos que se unen a proteínas de la superficie celular reconocidas en la técnica, que se sabe que

enriquecen las células iniciadoras de tumores (por ejemplo, marcadores potencialmente compatibles según se establecen en el documento de publicación PCT WO 2012/031280) y por lo tanto medir los niveles de TIC de varias muestras. En todavía otro método compatible, un experto en la técnica podría contar la frecuencia de TIC *in situ* (por ejemplo, en una sección de tejido) mediante inmunohistoquímica usando uno o varios anticuerpos o reactivos que son capaces de unirse a proteínas de la superficie celular que se cree que definen esas células.

Se reconocerá que numerosos marcadores (o su ausencia) se han asociado con diversas poblaciones de células madre del cáncer y se han utilizado para aislar o caracterizar subpoblaciones de células tumorales. A este respecto, ejemplos de marcadores de células madre de cáncer comprenden OCT4, Nanog, STAT3, EPCAM, CD24, CD34, NB84, TrkA, GD2, CD133, CD20, CD56, CD29, B7H3, CD46, receptor de transferrina, JAM3, carboxipeptidasa M, ADAM9, oncostatina M, Lgr5, Lgr6, CD324, CD325, nestina, Sox1, Bmi-1, eed, easyh1, easyh2, mf2, yy1, smarcAA, smarcA5, smarcD3, smarcE1, mlt3, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WNT10B, WNT16, AXIN1, BCL9, MYC, (TCF4) SLC7A8, IL1RAP, TEM8, Tmprss4, MUC16, GPRC5B, SLC6A14, SLC4A11, PPAP2C, CAV1, CAV2, PTPN3, EPHA1, EPHA2, SLC1A1, CX3CL1, ADORA2A, MPZL1, FLJ10052, C4,4A, EDG3, RARRES1, TMEMPAI, PTS, CEACAM6, NID2, STEAP, ABCA3, CRIM1, IL1R1, OPN3, DAF, MUC1, MCP, CPD, NMA, ADAM9, GJA1, SLC19A2, ABCA1, PCDH7, ADCY9, SLC39A1, NPC1, ENPP1, N33, GPNMB, LY6E, CELSR1, LRP3, C2orf52, TMEMPAI, FLVCR, PCDHA10, GPR54, TGFBR3, SEMA4B, PCDHB2, ABCG2, CD166, AFP, BMP-4, β -catenina, CD2, CD3, CD9, CD14, CD31, CD38, CD44, CD45, CD74, CD90, CXCR4, decorina, EGFR, CD105, CD64, CD16, CD16a, CD16b, GLI1, GLI2, CD49b y CD49f. Véase, por ejemplo, Schulenburg et al., 2010, PMID: 20185329, U.S.P.N. 7,632,678 y los documentos U.S.P.Ns. 2007/0292414, 2008/0175870, 2010/0275280, 2010/0162416 y 2011/0020221. Además, se apreciará que cada uno de los marcadores mencionados anteriormente también se puede usar como un antígeno diana secundario en el contexto de los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos de la presente descripción.

De manera similar, ejemplos no limitativos de fenotipos de la superficie celular asociados con células madre cancerosas de ciertos tipos de tumores incluyen CD44^{hi}CD24^{low}, ALDH⁺, CD133⁺, CD123⁺, CD34⁺CD38⁻, CD44⁺CD24⁻, CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁻, CD133⁺CD34⁺CD10⁻CD19⁻, CD138⁻CD34⁺CD19⁺, CD133⁺RC2⁺, CD44⁺ α_2 β_1 ^{hi}CD133⁺, CD44⁺CD24⁺ESA⁺, CD271⁺, ABCB5⁺, así como otros fenotipos de la superficie de células madre de cáncer que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schulenburg et al., 2010, supra, Visvader et al., 2008, PMID: 18784658 y el documento U.S.P.N. 2008/0138313. Los expertos en la materia apreciarán que los fenotipos marcadores, como los ejemplificados inmediatamente antes, se pueden usar junto con un análisis citométrico de flujo convencional y técnicas de clasificación de células para caracterizar, aislar, purificar o enriquecer las células o poblaciones de células TIC y/o TPC para un análisis adicional. De interés con respecto a la presente invención, CD46, CD324 y, opcionalmente, CD66c se expresan de forma elevada o heterogénea en la superficie de muchas células tumorales de tumores humanos colorrectales ("CR"), de mama ("BR"), de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), de pulmón de células pequeñas (SCLC), pancreáticos ("PA"), melanoma ("Mel"), de ovario ("OV") y cáncer de cabeza y cuello ("HN"), independientemente de si las muestras de tumores analizadas eran muestras primarias de tumores de pacientes o tumores de xenoinjerto no tradicional (NTX) obtenidos de pacientes.

Usando cualquiera de los métodos mencionados anteriormente y marcadores seleccionados como se conocen en la técnica, es posible cuantificar la reducción de la frecuencia de las TIC (o las TPC en las mismas) facilitada por los moduladores de DLL3 descritos (incluidos los conjugados con agentes citotóxicos) de acuerdo con las enseñanzas de este documento. En algunos casos, los compuestos de la presente descripción pueden reducir la frecuencia de TIC o TPC (por una variedad de mecanismos mencionados anteriormente, que incluyen la eliminación, la diferenciación inducida, la alteración de un nicho, el silenciamiento, etc.) en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o incluso en un 35%. En otros casos, la reducción en la frecuencia de TIC o TPC puede ser del orden del 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65%. En ciertos casos, los compuestos descritos pueden reducir la frecuencia de TIC o TPC en un 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o incluso un 95%. Por supuesto, se apreciará que cualquier reducción de la frecuencia de las TIC o TPC probablemente sea el resultado de una reducción correspondiente de la tumorigenicidad, persistencia, recidiva y agresividad de la neoplasia.

IV. Agentes de unión celular

1. Estructura de los anticuerpos

Como se ha mencionado anteriormente, los casos particularmente preferidos de la presente descripción comprenden los conjugados de DLL3 descritos con un agente de unión celular en forma de un anticuerpo, o un fragmento inmunorreactivo del mismo, que se asocia preferentemente con uno o varios dominios de una isoforma de la proteína DLL3 y, opcionalmente, otros miembros de la familia DLL. A este respecto, los anticuerpos, y sus variantes y derivados, incluidos los sistemas de nomenclatura y de numeración aceptados, se han descrito ampliamente, por ejemplo, en Abbas et al. (2010), Cellular and Molecular Immunology (6ª ed.), W.B. Saunders Company; o Murfey et al. (2011), Janeway's Immunobiology (8ª ed.), Garland Science.

Un "anticuerpo" o un "anticuerpo intacto" normalmente se refiere a una proteína tetramérica en forma de Y que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos ligeras (L) unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes e interacciones no covalentes. Las cadenas ligeras humanas comprenden un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), en donde el dominio constante puede clasificarse fácilmente como kappa o lambda basándose en la se-

cuencia de aminoácidos y los loci de los genes. Cada cadena pesada comprende un dominio variable (V_H) y una región constante, que en el caso de IgG, IgA e IgD, comprende tres dominios denominados C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} (IgM e IgE tienen un cuarto dominio, C_{H4}). En las clases IgG, IgA e IgD, los dominios C_{H1} y C_{H2} están separados por una región bisagra flexible, que es un segmento rico en prolina y cisteínas de longitud variable (generalmente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos en la IgG). Los dominios variables tanto en la cadena ligera como en la pesada están unidos a los dominios constantes por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos y la cadena pesada también tiene una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos adicionales. Cada clase de anticuerpo comprende además enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios formados por residuos de cisteína emparejados.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" puede interpretarse ampliamente e incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos multiclonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y primatizados, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos anti-idiotípicos, anticuerpos sintéticos, incluidas las muteínas y sus variantes, fragmentos de anticuerpos inmunoespecíficos como los fragmentos Fd, Fab, $F(ab')_2$, $F(ab')$, fragmentos de cadena sencilla (por ejemplo, ScFv y ScFvFc); y derivados de los mismos, incluidas las fusiones de Fc y otras modificaciones, y cualquier otra molécula inmunorreactiva, siempre que muestre una asociación o unión preferente con un determinante de DLL3. Además, a menos que las restricciones contextuales lo indiquen de otro modo, el término comprende además todas las clases de anticuerpos (es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y todos los isotipos (es decir, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos, generalmente se indican mediante la letra griega minúscula correspondiente α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las cadenas ligeras de los anticuerpos procedentes de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

En realizaciones seleccionadas y como se muestra en los Ejemplos adjuntos, el dominio C_L puede comprender un dominio kappa C_L . En otras realizaciones, el anticuerpo de origen puede comprender un dominio lambda C_L . Como las secuencias de todos los dominios C_L de IgG humana son bien conocidas, un experto en la técnica puede analizar fácilmente las secuencias lambda y kappa de acuerdo con la presente descripción y emplear las mismas para proporcionar estructuras artificiales de anticuerpos compatibles. De manera similar, para fines explicativos y de demostración, la siguiente explicación y los Ejemplos adjuntos presentarán principalmente los anticuerpos de tipo IgG1 (murinos o humanos). Al igual que con la región constante de la cadena ligera, las secuencias del dominio constante de la cadena pesada de diferentes isotipos (IgM, IgD, IgE, IgA) y las subclases (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2) son bien conocidas y están bien caracterizadas. Por consiguiente, un experto en la técnica puede explotar fácilmente los anticuerpos anti-DLL3 que comprenden cualquier isotipo o subclase y conjugar cada uno con las PBDs tal y como se describe en este documento, para proporcionar los conjugados de anticuerpo y fármaco de la presente descripción.

Los dominios variables de los anticuerpos muestran una variación considerable en la composición de aminoácidos de un anticuerpo a otro y son los principales responsables del reconocimiento y la unión del antígeno. Las regiones variables de cada pareja de cadenas ligeras/pesadas forman el sitio de unión del anticuerpo, de modo que un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión (es decir, es bivalente). Los dominios V_H y V_L comprenden tres regiones de extrema variabilidad, que se denominan regiones hipervariables, o más comúnmente, regiones determinantes de complementariedad (CDRs), enmarcadas y separadas por cuatro regiones menos variables conocidas como regiones estructurales (FRs). La asociación no covalente entre la región V_H y la V_L forma el fragmento Fv (de "fragmento variable") que contiene uno de los dos sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Los fragmentos ScFv (de fragmento variable de cadena sencilla), que pueden obtenerse mediante modificación genética, se asocian en una sola cadena polipeptídica, la región V_H y la V_L de un anticuerpo, separadas por un enlazador peptídico.

Tal y como se usa en este documento, la asignación de aminoácidos a cada dominio, región estructural y CDR puede ser de acuerdo con uno de los esquemas de numeración proporcionados por Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5ª ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242; Chothia et al., 1987, PMID: 3681981; Chothia et al., 1989, PMID: 2687698; MacCallum et al., 1996, PMID: 8876650; o Dubel, Ed. (2007) Handbook of Therapeutic Antibodies, 3ª ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., a menos que se indique lo contrario. Los residuos de aminoácidos que comprenden CDRs definidas según Kabat, Chothia y MacCallum, tal y como se obtienen a partir de la base de datos del sitio web de Abysis (infra.), se detallan a continuación.

TABLA 1

	Kabat	Chothia	MacCallum
CDR1 de V_H	31-35	26-32	30-35
CDR2 de V_H	50-65	52-56	47-58

	Kabat	Chothia	MacCallum
CDR3 de V _H	95-102	95-102	93-101
CDR1 de V _L	24-34	24-34	30-36
CDR2 de V _L	50-56	50-56	46-55
CDR3 de V _L	89-97	89-97	89-96

Las regiones variables y las CDRs en una secuencia de anticuerpos se pueden identificar de acuerdo con las reglas generales que se han desarrollado en la técnica (como se ha establecido anteriormente, como, por ejemplo, el sistema de numeración de Kabat) o alineando las secuencias frente a una base de datos de regiones variables conocidas. Los métodos para identificar estas regiones se describen en Kontermann y Dubel, compiladores, *Antibody Engineering*, Springer, Nueva York, NY, 2001 y Dinarello et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. Las bases de datos ejemplares de secuencias de anticuerpos se describen y se puede acceder a las mismas, a través del sitio web de "Abysis" en www.bioinf.org.uk/abs (mantenido por A.C. Martin en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la University College London, Londres, Inglaterra) y el sitio web de VBASE2 en www.vbase2.org, como se describe en Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33 (ejemplar de la base de datos): D671-D674 (2005). Preferiblemente, las secuencias se analizan utilizando la base de datos Abysis, que integra los datos de secuencias de Kabat, IMGT y el Banco de Datos de Proteínas (PDB) con los datos estructurales del PDB. Véase el capítulo del libro del Dr. Andrew C. R. Martin, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (compilador: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, también disponible en el sitio web bioinf.org.uk/abs). El sitio web de la base de datos de Abysis incluye además reglas generales que se han desarrollado para identificar CDRs que se pueden usar de acuerdo con las enseñanzas de este documento. A menos que se indique lo contrario, todas las CDRs establecidas en este documento se han obtenido de acuerdo con el sitio web de la base de datos Abysis según Kabat.

Para las posiciones de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada descritas en la invención, la numeración es de acuerdo con el índice Eu descrito por primera vez en Edelman et al., 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63(1): 78-85 que describe la secuencia de aminoácidos de la proteína de mieloma Eu, que supuestamente era la primera secuenciación de IgG1 humana. El índice Eu de Edelman también se establece en Kabat. *et al.* 1991 (*supra*). Por lo tanto, las expresiones "índice EU según lo establecido en Kabat" o "índice EU de Kabat" en el contexto de la cadena pesada, se refieren al sistema de numeración de residuos basado en el anticuerpo IgG1 Eu humano de Edelman *et al.* como se establece en Kabat *et al.* 1991 (*supra*). El sistema de numeración utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera se expone de manera similar en Kabat *et al.* 1991. Secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada kappa C_L e IgG1 a modo de ejemplo, compatibles con la presente invención se exponen como SEQ ID NO: 5 y 6 en la lista de secuencias adjunta. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de la región constante descritas pueden unirse con las regiones variables de la cadena ligera y pesada descritas usando técnicas convencionales de biología molecular para proporcionar anticuerpos de longitud completa que se pueden incorporar en los conjugados de DLL3 de la presente invención.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas de la descripción pueden comprender, o derivarse de, cualquier anticuerpo que reconozca o se asocia específicamente con cualquier determinante de DLL3. Tal como se usa en el presente documento, "determinante" o "diana" significa cualquier rasgo, propiedad, marcador o factor detectable que esté asociado de manera identificable, o que se encuentra específicamente en o sobre una célula, una población celular o un tejido particular. Los determinantes o dianas pueden ser de naturaleza morfológica, funcional o bioquímica y son preferiblemente fenotípicos. En ciertos casos preferidos, un determinante es una proteína que se expresa diferencialmente (con sobreexpresión o subexpresión) a través de tipos celulares específicos o por células en ciertas condiciones (por ejemplo, durante puntos específicos del ciclo celular o en células en un nicho particular). Para los fines de la presente descripción, un determinante se expresa preferentemente de manera diferencial en células cancerosas aberrantes y puede comprender una proteína DLL3, o cualquiera de sus variantes por corte y empalme, isoformas o miembros de la familia, o dominios, regiones o epítomos específicos de los mismos. Un "antígeno", "determinante inmunógeno", "determinante antigénico" o "inmunógeno" significa cualquier proteína (incluyendo DLL3) o cualquier fragmento, región, dominio o epítomo de la misma que puede estimular una respuesta inmune cuando se introduce en un animal inmunocompetente y es reconocida por anticuerpos producidos a partir de la respuesta inmune del animal. La presencia o ausencia de los determinantes contemplados en el presente documento se puede usar para identificar una célula, una subpoblación celular o un tejido (por ejemplo, tumores, células tumorígenas o CSCs).

Como se expone más adelante en los Ejemplos, los casos seleccionados de la descripción comprenden anticuerpos murinos que se unen inmunoespecíficamente a DLL3, que se pueden considerar anticuerpos "de origen". En otros casos, los anticuerpos contemplados por la descripción se pueden obtener a partir de tales anticuerpos "de origen" a través de una modificación opcional de la región constante o las secuencias de aminoácidos que se unen al epítomo del anticuerpo de origen. En un caso, un anticuerpo es "derivado" de un anticuerpo de origen, si los aminoácidos seleccionados en el anticuerpo de origen se alteran mediante delección, mutación, sustitución, integración o combinación. En otro caso, un anticuerpo "derivado" es uno en el que fragmentos del anticuerpo de origen (por ejemplo,

una o varias CDRs o la región variable completa) se combinan o se incorporan en una secuencia de anticuerpo aceptor para proporcionar el anticuerpo derivado (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, injertados con CDRs o humanizados). Estos anticuerpos "derivados" (por ejemplo, humanizados o injertados con CDRs) pueden generarse utilizando técnicas convencionales de biología molecular por diversos motivos, como por ejemplo, mejorar la afinidad hacia el determinante; mejorar la producción y el rendimiento en un cultivo celular; reducir la inmunogenicidad *in vivo*; reducir la toxicidad; facilitar la conjugación de un resto activo; o crear un anticuerpo multiespecífico. Esos anticuerpos también pueden obtenerse a partir de anticuerpos de origen mediante una modificación de la molécula madura (por ejemplo, patrones de glicosilación o pegilación) por medios químicos o una modificación postraduccional.

En el contexto de la presente invención, se apreciará que cualquiera de las CDRs de cadena ligera y pesada descritas, obtenidas a partir de las secuencias de aminoácidos de la región variable murina, indicadas en la FIG. 3A o la FIG. 3B, pueden combinarse con anticuerpos aceptores o reorganizarse para proporcionar anticuerpos anti-DLL3 humanos (por ejemplo, anti-hDLL3 humanizados o quiméricos) de acuerdo con las enseñanzas actuales. Es decir, una o varias de las CDRs derivadas u obtenidas a partir de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera contigua, indicadas en la FIG. 3A o las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada contigua, indicadas en la FIG. 3B (juntas, SEQ ID NOS: 21 - 387, números impares) se pueden incorporar en un modulador de DLL3 y, en realizaciones particularmente preferidas, en un anticuerpo injertado con CDRs o humanizado que se asocia de forma inmunoespecífica con una o varias isoformas de DLL3. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y pesada "derivadas" de tales moduladores humanizados, también se exponen en las FIGS. 3A y 3B (SEQ ID NO: 389 - 407, números impares).

En las FIGS. 3A y 3B, las CDRs anotadas y las secuencias estructurales se definen según Kabat utilizando una base de datos patentada de Abysis. Sin embargo, como se expone en el presente documento, un experto en la técnica podría definir, identificar, derivar y/o numerar fácilmente las CDRs como se define por Kabat et al., Chothia et al. o MacCallum et al., para cada secuencia de cadena pesada y ligera respectiva indicada en la FIG. 3A o la FIG. 3B. Por consiguiente, cada una de las CDRs objeto y los anticuerpos que comprenden CDRs definidas por todas esas nomenclaturas, se incluyen expresamente dentro del alcance de la presente descripción. En términos más generales, las expresiones "residuo de aminoácido de una CDR de la región variable" o más simplemente "CDR" incluyen aminoácidos en una CDR tal y como se identifica usando cualquier secuencia o método basado en la estructura como se ha descrito anteriormente. En este contexto, las CDRs de Kabat para los anticuerpos humanizados ejemplares en las FIGS. 3A y 3B, se proporcionan en la lista de secuencias adjunta como SEQ ID NO: 408 - 437.

En otros casos más, un anticuerpo de DLL3 compatible comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos ejemplares descritos en este documento (tanto humanizados como murinos), y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-DLL3 de la descripción.

Por ejemplo, los anticuerpos de DLL3 compatibles pueden comprender un anticuerpo o un fragmento inmunorreactivo del mismo que tiene una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 357, SEQ ID NO: 361, SEQ ID NO: 365, SEQ ID NO: 369, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO: 377, SEQ ID NO: 381 y SEQ ID NO: 385, y en donde dicha región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 295,

SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 307 SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 355, SEQ ID NO: 359, SEQ ID NO: 363, SEQ ID NO: 367, SEQ ID NO: 371, SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 383 y SEQ ID NO: 387.

5 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser homólogas en un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% a las secuencias indicadas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen una homología elevada (es decir, 80% o mayor) con las regiones V_H y V_L de las secuencias indicadas anteriormente, puede obtenerse o derivarse utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, como se muestra en la TABLA 4 a continuación, un anticuerpo humanizado derivado como se establece en el Ejemplo 4 a partir de un anticuerpo de origen murino, comprenderá regiones variables de cadena pesada y ligera que son aproximadamente del 75% al 85% homólogas a las del anticuerpo de origen.

10 Tal y como se usa en este documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones \times 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20 Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente descripción se pueden usar además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Estas búsquedas se pueden realizar utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de la descripción. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

2. Generación de anticuerpos

a. Anticuerpos policlonales

La producción de anticuerpos policlonales en diversos animales hospedadores, incluyendo conejos, ratones, ratas, etc., es bien conocida en la técnica. En algunos casos, el suero policlonal que contiene anticuerpos anti-DLL3 se obtiene sangrando o sacrificando al animal. El suero se puede usar con fines de investigación en la forma obtenida a partir del animal o, como alternativa, los anticuerpos anti-DLL3 pueden purificarse parcial o totalmente para proporcionar fracciones de inmunoglobulina o preparaciones de anticuerpo homogéneas.

45 Brevemente, el animal seleccionado se inmuniza con un inmunógeno de DLL3 (por ejemplo, DLL3 soluble o sDLL3) que, por ejemplo, puede comprender isoformas, dominios y/o péptidos seleccionados, o células vivas o preparaciones de células que expresan DLL3 o fragmentos inmunorreactivos de las mismas. Los adyuvantes conocidos en la técnica que se pueden usar para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies inoculadas, incluyen, pero que no están limitados a, adyuvantes de Freund (completos e incompletos), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y corynebacterium parvum. Tales adyuvantes pueden proteger el antígeno de una dispersión rápida al secuestrarlo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador para secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, la pauta de inmunización implicará dos o más administraciones del inmunógeno seleccionado repartidas durante un período de tiempo predeterminado.

55 La secuencia de aminoácidos de una proteína DLL3 como se muestra en la FIG. 1, se puede analizar para seleccionar regiones específicas de la proteína DLL3 para generar anticuerpos. Por ejemplo, un análisis de la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de una secuencia de aminoácidos de DLL3 se utiliza para identificar regiones hidrófilas en la estructura de DLL3. Las regiones de una proteína DLL3 que muestran una estructura inmunógena, así como otras

regiones y dominios, se pueden identificar fácilmente utilizando otros métodos conocidos en la técnica, como los análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf. Los perfiles de flexibilidad promedio se pueden generar usando el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32:242-255. Los perfiles de giro beta se pueden generar utilizando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering* 1:289-294. Por lo tanto, cada región, dominio o motivo de DLL3 identificado por cualquiera de estos programas o métodos está dentro del alcance de la presente descripción y puede aislarse o diseñarse para proporcionar inmunógenos que den lugar a moduladores que comprenden las propiedades deseadas. Los métodos preferidos para la generación de anticuerpos de DLL3 se ilustran adicionalmente por medio de los Ejemplos proporcionados en el presente documento. Los métodos para preparar una proteína o un polipéptido para uso como un inmunógeno, son bien conocidos en la técnica. También son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar conjugados inmunógenos de una proteína con un vehículo, tal como BSA, KLH u otra proteína transportadora. En algunas circunstancias, se usa la conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos los reactivos enlazadores son efectivos. La administración de un inmunógeno de DLL3 a menudo se realiza mediante una inyección durante un período de tiempo adecuado y con el uso de un adyuvante adecuado, como se entiende en la técnica. Durante la pauta de inmunización, se pueden tomar títulos de anticuerpos como se describe en los Ejemplos a continuación para determinar la idoneidad de la formación de anticuerpos.

b. *Anticuerpos monoclonales*

Además, la descripción contempla el uso de anticuerpos monoclonales. Como se conoce en la técnica, la expresión "anticuerpo monoclonal" (o mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones (por ejemplo, mutaciones naturales), que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. En ciertos casos, un anticuerpo monoclonal de ese tipo incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une o se asocia con un antígeno, en donde la secuencia polipeptídica que se une a antígeno se había obtenido mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica que se une a una diana a partir de una pluralidad de secuencias de polipéptidos.

De manera más general, y tal como se expone en los Ejemplos de este documento, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen técnicas de hibridoma, técnicas recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, animales transgénicos (por ejemplo, un Xenomouse®) o alguna combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando técnicas de hibridoma y bioquímicas y de modificación genética reconocidas en la técnica, tal y como se describen con más detalle en An, Zhigiang (compilador) *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley and Sons, 1ª ed. 2009; Shire et. al. (compiladores) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer Science + Business Media LLC, 1ª ed. 2010; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988; Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681* (Elsevier, N.Y., 1981). Debe entenderse que una secuencia de unión seleccionada puede alternarse aún más, por ejemplo, para mejorar la afinidad hacia la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a una diana alterada también es un anticuerpo de esta descripción.

c. *Anticuerpos quiméricos y humanizados*

En otro caso, los anticuerpos de la descripción pueden comprender anticuerpos quiméricos obtenidos a partir de segmentos de proteínas unidos covalentemente de al menos dos especies o clases de anticuerpos diferentes. El término anticuerpos "quiméricos" se dirige a estructuras artificiales en las que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos a partir de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de tales anticuerpos (documento U.S. P.N. 4.816.567; Morrison *et al.*, 1984, PMID: 6436822).

En una realización, un anticuerpo quimérico puede comprender secuencias de aminoácidos murinos de V_H y V_L y regiones constantes obtenidas a partir de fuentes humanas, por ejemplo, anticuerpos humanizados como se describe a continuación. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden estar "injetados con CDRs", en donde el anticuerpo comprende una o varias CDRs de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) de anticuerpos es idéntico u homólogo a una secuencia correspondiente en anticuerpos obtenidos a partir de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Para el uso en humanos, las CDRs de roedor seleccionadas, por ejemplo, las CDRs de ratón pueden injertarse en un anticuerpo humano, reemplazando una o varias de las CDRs de origen natural del anticuerpo humano. Estas estructuras artificiales generalmente tienen las ventajas de proporcionar funciones de anticuerpos de potencia total, por ejemplo, una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), al tiempo que se reducen las respuestas inmunes no deseadas frente al anticuerpo por parte del sujeto.

Similar al anticuerpo injertado con CDRs es el anticuerpo "humanizado". Tal y como se usa en este documento, las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que comprenden secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de una o varias inmunoglobulinas no humanas. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor o aceptor) en la que los residuos de una o varias CDRs del receptor se reemplazan por residuos de una o varias CDRs de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano. En ciertas realizaciones preferidas, los residuos en una o varias FRs en el dominio variable de la inmunoglobulina humana, se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes del anticuerpo donante para ayudar a mantener la configuración tridimensional apropiada de la(s) CDR(s) injertada(s) y de este modo mejorar la afinidad. Esto puede ser referido como la introducción de "retromutaciones". Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante para, por ejemplo, refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo.

Se pueden usar varias fuentes para determinar qué secuencias humanas se van a emplear en los anticuerpos humanizados. Tales fuentes incluyen secuencias de la línea germinal humana que se describen, por ejemplo, en Tomlinson, I. A. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* 16: 237-242; Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J* 14:4628-4638; the V-BASE directory (VBASE2 - Retter et al., *Nucleic Acid Res.* 33; 671-674, 2005) que proporcionan un directorio completo de secuencias de regiones variables de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I. A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido); o de FRs de consenso humanas descritas, por ejemplo, en el documento U.S.P.N. 6.300.064.

Los injertos de CDRs y los anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en los documentos U.S.P.Ns. 6.180.370 y 5.693.762. Para más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.* 1986, PMID: 3713831; y los documentos U.S.P.Ns. 6.982.321 y 7.087.409.

Otro método se denomina "humanización" que se describe, por ejemplo, en el documento U.S.P.N. 2005/0008625. En otra realización, un anticuerpo no humano se puede modificar mediante delección específica de epítomos de linfocitos T humanos o "desinmunización" por los métodos descritos en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317.

Como se ha descrito anteriormente en realizaciones seleccionadas, al menos el 60%, el 65%, el 70%, el 75% o el 80% de los residuos de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera o pesada del anticuerpo injertado con CDRs o humanizado se corresponderán con los de las secuencias humanas receptoras. En otras realizaciones, al menos el 83%, el 85%, el 87% o el 90% de los residuos de la región variable del anticuerpo humanizado se corresponderán con los de las secuencias humanas receptoras. En una realización preferida adicional, más del 95% de cada una de las regiones variables del anticuerpo humanizado se corresponderán con las de las secuencias humanas receptoras.

La identidad de secuencia o la homología de la región variable del anticuerpo humanizado con la región variable del aceptor humano se puede determinar como se ha descrito previamente y, cuando se mide como tal, compartirá preferiblemente al menos un 60% o 65% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos un 93%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos se diferencian por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o el grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución.

d. Anticuerpos humanos

En otra realización, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos completamente humanos. La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha realizado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos.

Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversos métodos conocidos en la técnica. Una técnica es la presentación en fagos en la que se sintetiza una genoteca de anticuerpos (preferiblemente humanos) sobre fagos, la genoteca se escruta con el antígeno de interés o una porción del mismo que se une a antígeno, y se aísla el fago que se une al antígeno, a partir del cual se pueden obtener los fragmentos inmunorreactivos. Los métodos para preparar y escrutar tales genotecas son bien conocidos en la técnica y los kits para generar genotecas de presentación en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos de Stratagene SurfZAP™, número de catálogo 240612). También hay otros métodos y reactivos que se pueden usar para generar y escrutar genotecas de presentación de anticuerpos (véanse, por ejemplo, los documentos U.S.P.N. 5.223.409; publicaciones PCT nº WO

92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; y Barbas et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 88:7978-7982 (1991)).

5 En un caso, los anticuerpos humanos recombinantes se pueden aislar escrutando una genoteca de anticuerpos combinatorios recombinantes, preparada como anteriormente. En un caso, la genoteca es una genoteca de presentación en fagos de scFv, generada empleando ADNc de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm aislado de linfocitos B.

10 Los anticuerpos producidos por genotecas vírgenes (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (K_a de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración por afinidad también se puede imitar *in vitro* mediante la construcción y la selección de nuevo de genotecas secundarias, tal y como se describe en la técnica. Por ejemplo, la mutación se puede introducir al azar *in vitro* utilizando una polimerasa propensa a errores (descrita por Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)). Además, la maduración por afinidad se puede realizar mediante una mutación aleatoria de una o varias CDRs, p. ej., utilizando una PCR con cebadores que son portadores de una secuencia aleatoria que incluye la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y escrutando en busca de clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 ha descrito un método para inducir mutagénesis en una CDR de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una genoteca de genes de la cadena ligera. Otro enfoque efectivo es recombinar los dominios V_H o V_L seleccionados mediante una presentación en fagos con repertorios de variantes de dominio V naturales, obtenidos a partir de donantes no inmunizados y escrutados en busca de una afinidad más alta en varias rondas de reorganización de cadenas, tal y como se describe en Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con una constante de disociación K_D (k_{off}/k_{on}) de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

15 En otros casos, se pueden emplear procedimientos similares utilizando genotecas que comprenden células eucariotas (por ejemplo, levadura) que expresan parejas de unión en su superficie. Véanse, por ejemplo, los documentos U.S.P.N. 7.700.302 y U.S.S.N. 12/404.059. En un caso, el anticuerpo humano se selecciona a partir de una genoteca de fagos, en donde esa genoteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al. Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets et al. Proc. Natl Acad Sci. USA 95:6157-6162 (1998). En otros casos, las parejas de unión humanas se pueden aislar a partir de genotecas de anticuerpos combinatorias generadas en células eucariotas tales como levadura. Véase, por ejemplo, el documento U.S.P.N. 7.700.302. Tales técnicas permiten ventajosamente el escrutinio de un gran número de moduladores candidatos y proporcionan una manipulación relativamente sencilla de las secuencias candidatas (por ejemplo, mediante maduración por afinidad o reorganización recombinante).

20 Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente y se han introducido genes de inmunoglobulina humana. Después del estímulo, se observa una producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos U.S.P.Ns. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y U.S.P.Ns. 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XenoMouse®; y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar a través de una inmortalización de los linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar a partir de un individuo que padece un trastorno neoplásico o se pueden haber inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol, 147 (1): 86-95 (1991); y el documento U.S.P.N. 5.750.373.

3. Producción recombinante de anticuerpos

25 Los anticuerpos y sus fragmentos se pueden producir o modificar utilizando material genético obtenido a partir de células productoras de anticuerpos y tecnología recombinante (véase, por ejemplo, Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology vol. 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook y Russell (compiladores) (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.), NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (complementado hasta 2006); y el documento U.S.P.N. 7.709.611).

30 Más particularmente, otro aspecto de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o se "vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica separándolo de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas convencionales, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Un ácido nucleico de la descripción puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. Más generalmente, la expresión "ácido nucleico", tal y como se usa en el presente documento, incluye ADN genómico, ADNc, ARN y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos), ya sean de cadena sencilla o de cadena doble. En un caso preferido, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la descripción se pueden obtener usando técnicas convencionales de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que son portadores de genes de inmunoglobulina humana como se describen más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma, se pueden obtener mediante técnicas convencionales de amplificación con PCR o clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de genes de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar a partir de la genoteca.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de V_H y V_L , estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En esas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_H o V_L está ligado funcionalmente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "ligado funcionalmente", tal y como se usa en este contexto, se entiende que significa que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa ligando funcionalmente el ADN que codifica V_H con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Publicación de NIH nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que incluyen esas regiones se pueden obtener mediante amplificación con PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferiblemente es una región constante de una IgG1 o IgG4. Como se describe con más detalle a continuación, una región constante de IgG1 ejemplar que es compatible con las enseñanzas de este documento, se indica como SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias adjunta. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H se puede ligar funcionalmente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante $CH1$ de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera Fab) ligando funcionalmente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, C_L . Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Publicación de NIH nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que incluyen esas regiones se pueden obtener mediante amplificación con PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero lo más preferiblemente es una región constante kappa. A este respecto, una región constante de la cadena ligera kappa compatible ejemplar, se indica como SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias adjunta.

La presente descripción también proporciona vectores que comprenden tales ácidos nucleicos descritos anteriormente, que pueden estar ligados funcionalmente a un promotor (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807; WO 89/01036; y U.S.P.N. 5.122.464); y otros elementos de control reguladores de la transcripción y de procesamiento de la vía secretora eucariota. La descripción también proporciona células hospedadoras que albergan esos vectores y sistemas de expresión en un hospedador.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de expresión en un hospedador" incluye cualquier tipo de sistema celular que se pueda modificar genéticamente para generar los ácidos nucleicos o los polipéptidos y anticuerpos de la descripción. Tales sistemas de expresión en un hospedador incluyen, pero no se limitan a microorganismos (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) transformados o transfectados con ADN de bacteriófago recombinante o ADN de plásmido; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*) transfectadas con vectores de expresión en levadura recombinantes; o células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO-S, HEK-293T, 3T3) que albergan estructuras artificiales de expresión recombinantes que contienen promotores obtenidos a partir del genoma de células o virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus). La célula hospedadora se puede cotransfectar con dos vectores de expresión, por ejemplo, el primer vector que codifica un polipéptido obtenido a partir de una cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido obtenido a partir de una cadena ligera.

Los métodos para transformar células de mamífero son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos U.S.P.N.s. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. La célula hospedadora también se puede modificar genéticamente para permitir la producción de una molécula que se une a antígeno con diversas características (por ejemplo, glicofomas modificadas o proteínas que tienen actividad GnTIII).

Para una producción a largo plazo de alto rendimiento, de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por consiguiente, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo seleccionado se pueden modificar genéticamente utilizando métodos reconocidos en la técnica convencional y que forman parte de la descripción. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células hospedadoras se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo,

secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Se puede usar cualquiera de los sistemas de selección bien conocidos en la técnica, incluido el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) que proporciona un enfoque eficaz para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se describe en su totalidad o en parte en relación con los documentos EP 0 216 846, EP 0 256 055, EP 0 323 997 y EP 0 338 841 y U.S.P.N.s 5.591.639 y 5.879.936. Otro sistema de expresión preferido para el desarrollo de líneas celulares estables es el kit Freedom™ CHO-S (Life Technologies).

Una vez que se ha producido un anticuerpo de la descripción mediante expresión recombinante o cualquier otra de las técnicas descritas, se puede purificar o aislar mediante métodos conocidos en la técnica, lo que significa que se identifica y se separa y se recupera desde su entorno natural y se separa de contaminantes que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo. Los anticuerpos aislados incluyen anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes.

Estas preparaciones aisladas se pueden purificar utilizando diversos métodos reconocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y de exclusión por tamaño, diálisis, diafiltración y cromatografía por afinidad, particularmente cromatografía por afinidad de Proteína A o Proteína G.

4. Selección posterior a la producción.

Sin importar cómo se han obtenido, las células productoras de anticuerpos (p. ej., hibridomas, colonias de levadura, etc.) pueden seleccionarse, clonarse y escrutarse adicionalmente para obtener características deseables, que incluyen, por ejemplo, un crecimiento robusto, una producción elevada de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, como una afinidad elevada hacia el antígeno de interés. Los hibridomas se pueden expandir *in vitro* en un cultivo celular o *in vivo* en animales inmunocomprometidos singénicos. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas y/o colonias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Una vez que se identifican los anticuerpos deseados, el material genético relevante se puede aislar, manipular y expresar utilizando métodos de biología molecular y bioquímicos comunes reconocidos en la técnica.

Los anticuerpos producidos por genotecas vírgenes (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (K_a de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}). Para mejorar la afinidad, la maduración por afinidad puede ser imitada *in vitro* mediante la construcción de genotecas de anticuerpos (por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones aleatorias *in vitro* mediante el uso de una polimerasa propensa a errores) y la selección de nuevo de los anticuerpos con una afinidad elevada hacia el antígeno a partir de esas genotecas secundarias (por ejemplo, mediante el uso de la presentación en fagos o levaduras). El documento WO 9607754 describe un método para inducir mutagénesis en una CDR de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una genoteca de genes de la cadena ligera.

Se pueden usar diversas técnicas para seleccionar anticuerpos, entre las que se incluyen, sin limitarse a, la presentación en fagos o levaduras en donde se sintetiza una genoteca de anticuerpos combinatorios humanos o fragmentos scFv sobre fagos o levaduras, la genoteca se escruta con el antígeno de interés o una porción del mismo que se une a antígeno, y el fago o levadura que se une al antígeno se aísla, a partir del cual se pueden obtener los anticuerpos o fragmentos inmunorreactivos (Vaughan *et al.*, 1996, PMID: 9630891; Sheets *et al.*, 1998, PMID: 9600934; Boder *et al.*, 1997, PMID: 9181578; Pepper *et al.*, 2008, PMID: 18336206). Los kits para generar genotecas de presentación en fagos o levaduras están disponibles comercialmente. También hay otros métodos y reactivos que se pueden usar para generar y escrutar genotecas de presentación de anticuerpos (véanse los documentos U.S.P.N. 5.223.409; WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; y Barbas *et al.*, 1991, PMID: 1896445). Tales técnicas permiten ventajosamente el escrutinio de grandes cantidades de anticuerpos candidatos y ofrecen una manipulación de las secuencias relativamente sencilla (por ejemplo, mediante reorganización recombinante).

5. Fragmentos de anticuerpos y derivados

a. Fragmentos

Independientemente de qué forma del modulador (por ejemplo, quimérico, humanizado, etc.) se selecciona para poner en práctica la invención, se apreciará que se pueden usar fragmentos inmunorreactivos del mismo de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. Un "fragmento de anticuerpo" comprende al menos una porción de un anticuerpo intacto. Tal y como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, y la expresión "fragmento que se une a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o un anticuerpo que se une o reacciona inmunoespecíficamente con un antígeno seleccionado o un determinante inmunógeno del mismo o que compite con el anticuerpo intacto a partir del cual se han obtenido los fragmentos para una unión específica al antígeno.

Los fragmentos ejemplares incluyen: V_L , V_H , scFv, fragmento F(ab')₂, fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmentos de anticuerpos de dominio único, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, un fragmento activo comprende una porción del anticuerpo que conserva su capacidad para interactuar con el antígeno/sustratos o receptores y modificarlos de una manera similar a la de un anticuerpo intacto (aunque quizás con algo menos de

eficiencia).

En otras realizaciones, un fragmento de anticuerpo es uno que comprende la región Fc y que conserva al menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión del complejo. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de ese tipo puede comprender un brazo que se une a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

Como bien reconocerán los expertos en la técnica, los fragmentos se pueden obtener mediante un tratamiento químico o enzimático (como papaína o pepsina) de un anticuerpo o una cadena de anticuerpo intacta o completa o por medios recombinantes. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, compilador, Raven Press, N.Y. (1999), para una descripción más detallada de los fragmentos de anticuerpos.

b. Anticuerpos multivalentes

En un caso, los moduladores de la descripción pueden ser monovalentes o multivalentes (por ejemplo, bivalentes, trivalentes, etc.). Tal y como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión a dianas potenciales asociados con un anticuerpo. Cada sitio de unión a una diana se une específicamente a una molécula diana o a una posición específica o a un locus en una molécula diana. Cuando un anticuerpo es monovalente, cada sitio de unión de la molécula se unirá específicamente a una única posición del antígeno o epítipo. Cuando un anticuerpo comprende más de un sitio de unión a la diana (multivalente), cada sitio de unión a la diana se puede unir específicamente a la misma o a diferentes moléculas (por ejemplo, se puede unir a ligandos diferentes o a antígenos diferentes, o a diferentes epítopos o posiciones en el mismo antígeno). Véase, por ejemplo, el documento U.S.P.N. 2009/0130105. En cada caso, al menos uno de los sitios de unión comprenderá un epítipo, un motivo o un dominio asociado con una isoforma de DLL3.

En una realización, los moduladores son anticuerpos biespecíficos en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades, tal y como se describe en Millstein et al., 1983, *Nature*, 305:537-539. Otros casos incluyen anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos. Otras estructuras artificiales multiespecíficas compatibles más sofisticadas y sus métodos de preparación se exponen en los documentos U.S.P.N. 2009/0155255, así como en WO 94/04690; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology*, 121:210; y WO96/27011.

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos multivalentes se pueden unir inmunoespecíficamente a diferentes epítopos de la molécula diana deseada o pueden unirse inmunoespecíficamente tanto a la molécula diana como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Si bien los casos preferidos de los anticuerpos anti-DLL3 solo se unen a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como los anticuerpos trispecíficos, también se incluyen en la presente descripción. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (documento U.S.P.N. 4.676.980), y para el tratamiento de una infección con VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en el documento U.S. P.N. 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

En todavía otras realizaciones, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de inmunoglobulinas, tales como un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de la bisagra, regiones C_H2 y/o C_H3, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

c. Modificaciones de la región Fc

Además de las diversas modificaciones, sustituciones, adiciones o deleciones de la región variable o de unión de los anticuerpos descritos anteriormente, los expertos en la técnica apreciarán que las realizaciones seleccionadas de la presente invención también pueden comprender sustituciones o modificaciones de la región constante (es decir, la región Fc). Más particularmente, se contempla que los moduladores de DLL3 de la descripción pueden contener, entre otros, una o varias sustituciones, mutaciones y/o modificaciones adicionales de residuos de aminoácidos que dan como resultado un compuesto con características preferidas que incluyen, pero no se limitan a: farmacocinética alterada, semivida en suero incrementada, afinidad de la unión incrementada, inmunogenicidad reducida, producción incrementada, unión del ligando de Fc alterada a un receptor de Fc (FcR), actividad "ADCC" incrementada o reducida (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos) o "CDC" (citotoxicidad dependiente del complejo), glicosilación y/o enlaces disulfuro alterados y especificidad de la unión modificada. A este respecto, se apreciará que estas variantes de Fc se pueden usar ventajosamente para mejorar las propiedades antineoplásicas efectivas de los moduladores descritos.

Para este fin, ciertas realizaciones de la invención pueden comprender sustituciones o modificaciones de la región

Fc, por ejemplo, la adición de uno o varios residuos de aminoácidos, sustituciones, mutaciones y/o modificaciones para producir un compuesto con funciones efectoras de Fc mejoradas o preferidas. Por ejemplo, cambios en los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción entre el dominio Fc y un receptor de Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRIIA y B, FcγRIII y FcRn) pueden conducir a un aumento de la citotoxicidad y/o a una farmacocinética alterada, como un aumento de la semivida en suero (véase, por ejemplo, Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)).

En realizaciones seleccionadas, los anticuerpos con un aumento *in vivo* de la semivida, se pueden generar modificando (por ejemplo, sustituyendo, delecionando o añadiendo) residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véanse, por ejemplo, los documentos de publicaciones internacionales nº WO 97/34631; WO 04/029207; U.S.P.N. 6.737.056 y U.S.P.N. 2003/0190311). Con respecto a esas realizaciones, las variantes de Fc pueden proporcionar semividas en un mamífero, preferiblemente un ser humano, de más de 5 días, más de 10 días, más de 15 días, preferiblemente más de 20 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses o más de 5 meses. El aumento de la semivida da como resultado un título sérico más alto que, por lo tanto, reduce la frecuencia de la administración de los anticuerpos y/o reduce la concentración de los anticuerpos que se van a administrar. La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos que se unen con afinidad elevada con FcRn humano, se pueden analizar, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcRns. Véase también, por ejemplo, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

En otras realizaciones, las alteraciones de Fc pueden conducir a una actividad de ADCC o CDC mejorada o reducida. Como se conoce en la técnica, CDC se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento, y ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada se une a FcRs presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos y macrófagos) que permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. En el contexto de la presente invención, las variantes de anticuerpos se proporcionan con una afinidad de unión a FcR "alterada", la cual es una unión incrementada o disminuida en comparación con un anticuerpo parental o no modificado o con un anticuerpo que comprende una secuencia natural de FcR. Tales variantes que muestran una unión disminuida pueden poseer poca o ninguna unión apreciable, por ejemplo, un 0-20% de unión al FcR, en comparación con una secuencia natural, por ejemplo, según lo determinado por métodos bien conocidos en la técnica. En otras realizaciones, la variante mostrará una unión mejorada en comparación con el dominio Fc de la inmunoglobulina natural. Se apreciará que estos tipos de variantes de Fc se pueden usar ventajosamente para potenciar las propiedades antineoplásicas eficaces de los anticuerpos descritos. En todavía otras realizaciones, tales alteraciones conducen a una afinidad de la unión incrementada, una inmunogenicidad reducida, una producción incrementada, una glicosilación y/o enlaces disulfuro alterados (por ejemplo, para sitios de conjugación), una especificidad de la unión modificada, una fagocitosis aumentada; y/o una regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B; BCR), etc.

d. Glicosilación alterada

Otros casos más comprenden una o varias glicofomas modificadas por ingeniería genética, es decir, un modulador de DLL3 que comprende un patrón de glicosilación alterado o una composición de carbohidratos alterada que se fija covalentemente a la proteína (por ejemplo, en el dominio Fc). Véase, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740. Las glicofomas modificadas genéticamente pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero que no están limitados a, mejorar o reducir la función efectora, aumentar la afinidad del modulador hacia una diana o facilitar la producción del modulador. En ciertas realizaciones en las que se desea una función efectora reducida, la molécula se puede modificar genéticamente para expresar una forma aglicosilada. Las sustituciones que pueden dar como resultado una eliminación de uno o varios sitios de glicosilación de la región estructural variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio, son bien conocidas (véanse, p. ej., los documentos U.S. P.Ns. 5.714.350 y 6.350.861). A la inversa, las funciones efectoras mejoradas o la unión mejorada se pueden impartir a la molécula que contiene Fc modificando genéticamente uno o varios sitios de glicosilación adicionales.

Otras realizaciones incluyen una variante de Fc que tiene una composición de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNAc bisectadas incrementadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Las glicofomas modificadas genéticamente se pueden generar por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de cepas con expresión modificada por ingeniería genética o variantes, mediante la coexpresión con una o varias enzimas (por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTI11)), expresando un molécula que comprende una región Fc en varios organismos o líneas celulares procedentes de varios organismos o modificando el o los carbohidratos después de que la molécula que comprende la región Fc se haya expresado (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/117002).

e. Procesamiento adicional

Los moduladores se pueden modificar diferencialmente durante o después de la producción, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitación a, la escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

Varias modificaciones postraduccionales también incluidas en la invención incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, procesamiento de los extremos N-terminales o C-terminales, fijación de restos químicos a la estructura principal del aminoácido, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, y adición o deleción de un residuo de metionina N-terminal como resultado de la expresión de una célula hospedadora procariota. Además, los moduladores también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, radioisotópico o de afinidad, para permitir la detección y el aislamiento del modulador.

6. Características del anticuerpo

Independientemente de cómo se obtenga o cuál de las formas mencionadas anteriormente tome el modulador, varios casos de los moduladores descritos pueden mostrar ciertas características. En casos seleccionados, las células productoras de anticuerpos (p. ej., hibridomas o colonias de levadura) se pueden seleccionar, clonar y escrutar adicionalmente para obtener propiedades favorables que incluyen, por ejemplo, un crecimiento robusto, una producción elevada de modulador y, como se describe con más detalle a continuación, características deseables del modulador. En otros casos, las características del modulador se pueden impartir o estar influidas seleccionando un antígeno particular (por ejemplo, una isoforma de DLL3 específica) o un fragmento inmunorreactivo del antígeno diana para la inoculación del animal. En otros casos, los moduladores seleccionados se pueden modificar genéticamente como se ha descrito anteriormente para mejorar o refinar las características inmunoquímicas, tales como la afinidad o la farmacocinética.

a. Anticuerpos neutralizantes

En ciertas realizaciones, los conjugados comprenderán anticuerpos "neutralizantes" o derivados o fragmentos de los mismos. Es decir, la presente descripción puede comprender moléculas de anticuerpos que se unen a dominios, motivos o epítopos específicos y son capaces de bloquear, reducir o inhibir la actividad biológica de DLL3. Más en general, la expresión "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que se une o interacciona con una molécula diana o un ligando y evita la unión o la asociación de la molécula diana a un ligando como un receptor o un sustrato, interrumpiendo de este modo una respuesta biológica que de otra manera daría como resultado la interacción de las moléculas.

Se apreciará que se pueden usar ensayos de unión competitiva conocidos en la técnica para evaluar la unión y la especificidad de un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional o un derivado del mismo. Con respecto a la presente invención, se desarrolla un anticuerpo o un fragmento para inhibir o reducir la unión de DLL3 a un ligando o un sustrato cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de ligando unido a DLL3 en al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más, según lo medido, por ejemplo, por la actividad del receptor Notch o en un ensayo *in vitro* de unión competitiva. En el caso de anticuerpos para DLL3, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante o un antagonista alterará preferiblemente la actividad del receptor Notch en al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90 %, 95%, 97%, 99% o más. Se apreciará que esta actividad modificada se puede medir directamente utilizando métodos reconocidos en la técnica o se puede medir por el impacto que tiene la actividad alterada aguas abajo (por ejemplo, oncogénesis, supervivencia celular o activación o supresión de genes sensibles a Notch). Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad de DLL3 se evalúa mediante la inhibición de la unión de DLL3 a un receptor Notch o evaluando su capacidad para atenuar la represión mediada por DLL3 de la señalización de Notch.

b. Anticuerpos internalizantes

Existe una evidencia de que una porción sustancial de la proteína DLL3 expresada permanece asociada con la superficie celular tumorigénica, lo que permite la localización e internalización de los moduladores descritos. En casos preferidos, tales moduladores se pueden asociar o conjugar con agentes anticancerígenos, tales como restos citotóxicos que destruyen la célula durante la internalización. En casos particularmente preferidos, el modulador comprenderá un conjugado de anticuerpo internalizante y fármaco.

Tal y como se usa en este documento, un modulador que "internaliza" es uno que es captado (junto con cualquier carga útil) por la célula después de unirse a un antígeno o un receptor asociado. Como se apreciará, el modulador de la internalización puede, en casos preferidos, comprender un anticuerpo que incluye fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos, así como conjugados de anticuerpo. La internalización puede ocurrir *in vitro* o *in vivo*. Para aplicaciones terapéuticas, la internalización se producirá preferentemente *in vivo* en un sujeto que lo necesite. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas puede ser suficiente o adecuado para destruir una célula que expresa un antígeno, especialmente una célula madre cancerosa que expresa un antígeno. Dependiendo de la po-

tencia del anticuerpo o del conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una única molécula de anticuerpo en la célula es suficiente para destruir la célula diana a la que se une el anticuerpo. Por ejemplo, ciertas toxinas son tan potentes que la internalización de unas pocas moléculas de la toxina conjugada con el anticuerpo es suficiente para destruir la célula tumoral. Si un anticuerpo se internaliza después de la unión a una célula de mamífero se puede determinar mediante diversos ensayos reconocidos en la técnica, incluidos los descritos en los Ejemplos a continuación. Los métodos para detectar si un anticuerpo se internaliza en una célula también se describen en el documento U.S.P.N. 7.619.068.

c. Anticuerpos reductores

En otras realizaciones, los anticuerpos comprenderán anticuerpos reductores o derivados o fragmentos de los mismos. El término anticuerpo "reductor" se refiere a un anticuerpo que preferiblemente se une o se asocia con un antígeno en o cerca de la superficie celular e induce, favorece o causa la muerte o la eliminación de la célula (por ejemplo, mediante CDC, ADCC o introducción de un agente citotóxico). En algunos casos, los anticuerpos reductores seleccionados se asociarán o se conjugarán con un agente citotóxico.

Preferiblemente, un anticuerpo reductor podrá retirar, incapacitar, eliminar o destruir al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de las células tumorígenas con DLL3 en una población celular definida. En algunas realizaciones, la población celular puede comprender células que perpetúan tumores, enriquecidas, seccionadas, purificadas o aisladas. En otras realizaciones, la población celular puede comprender muestras de tumores completos o extractos de tumores heterogéneos que comprenden células que perpetúan tumores. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar técnicas bioquímicas convencionales como las que se describen en los Ejemplos a continuación (por ejemplo, los Ejemplos 8 a 10) para realizar un seguimiento y cuantificar la reducción de células tumorígenas o de células que perpetúan tumores de acuerdo con las enseñanzas de este documento.

d. Agrupamiento y cartografiado de epítomos

Se apreciará adicionalmente que los moduladores de anticuerpos anti-DLL3 descritos se asociarán con, o se unirán a, epítomos discretos o determinantes inmunógenos presentados por la diana seleccionada o un fragmento de la misma. En ciertas realizaciones, los epítomos o determinantes inmunógenos incluyen grupos de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Por lo tanto, tal y como se usa en el presente documento, el término "epítomo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o a un receptor de linfocitos T o que interacciona de otra manera con una molécula. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente (o se une o reacciona inmunoespecíficamente) a un antígeno, cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En realizaciones preferidas, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio (K_D) es menor o igual a 10^{-6} M o menor que o igual a 10^{-7} M, más preferiblemente cuando la constante de disociación de equilibrio es menor o igual a 10^{-8} M, e incluso más preferiblemente cuando la constante de disociación es menor o igual a 10^{-9} M.

Más directamente, el término "epítomo" se utiliza en su sentido bioquímico común y se refiere a la porción del antígeno diana capaz de ser reconocida y de unirse específicamente a un modulador de anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido tal como DLL3, los epítomos se pueden formar generalmente a partir de los aminoácidos contiguos y los aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína ("epítomos conformacionales"). En tales epítomos conformacionales, los puntos de interacción se producen a través de los residuos de aminoácidos en la proteína que están separados linealmente entre sí. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos (a veces denominados epítomos "lineales" o "continuos") se conservan normalmente después de la desnaturalización de las proteínas, mientras que los epítomos formados por un plegamiento terciario se pierden normalmente después de la desnaturalización de proteínas. En cualquier caso, un epítomo de un anticuerpo normalmente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

A este respecto, se apreciará que, en ciertas realizaciones, un epítomo puede estar asociado con, o residir en, una o varias regiones, dominios o motivos de la proteína DLL3 (por ejemplo, los aminoácidos 1-618 de la isoforma 1). Tal y como se describe con más detalle en el presente documento, la región extracelular de la proteína DLL3 comprende una serie de dominios generalmente reconocidos que incluyen seis dominios de tipo EGF y un dominio DSL. Para los fines de la presente descripción, el término "dominio" se usará de acuerdo con su significado generalmente aceptado y se considerará que se refiere a una entidad estructural conservada identificable o definible dentro de una proteína que muestra un contenido distintivo en una estructura secundaria. En muchos casos, los dominios homólogos con funciones comunes generalmente mostrarán similitudes de secuencia y se encontrarán en varias proteínas dispares (por ejemplo, los dominios de tipo EGF se encuentran en al menos 471 proteínas diferentes). De manera similar, el término "motivo" reconocido en la técnica se utilizará de acuerdo con su significado común y generalmente se referirá a una región corta y conservada de una proteína que generalmente tiene entre diez y veinte residuos de aminoácidos contiguos. Como se indica a lo largo de este documento, los casos seleccionados comprenden moduladores que se asocian o se unen con un epítomo dentro de regiones, dominios o motivos específicos de DLL3.

En cualquier caso, una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítipo, por ejemplo, inmunizando con un péptido que comprende el epítipo usando técnicas descritas en la presente descripción. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y la caracterización de anticuerpos puede dilucidar una información sobre los epítipos deseables localizados en dominios o motivos específicos. A partir de esa información, es posible entonces escrutar de forma competitiva anticuerpos que se unen al mismo epítipo. Un enfoque para lograr esto es realizar estudios de competencia para encontrar anticuerpos que se unen competitivamente entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por unirse con el antígeno. Un procedimiento de alto rendimiento para agrupar anticuerpos basándose en su competencia cruzada se describe en el documento WO 03/48731. Otros métodos para agrupar o cartografiar a nivel de dominio o de epítipos que comprenden una competencia del modulador o una expresión del fragmento de antígeno en levadura, se exponen en los Ejemplos a continuación.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "agrupamiento" se refiere a los métodos utilizados para agrupar o clasificar los anticuerpos en función de sus características de unión a antígeno y su competencia. Si bien las técnicas son útiles para definir y categorizar los moduladores de la presente descripción, los agrupamientos no siempre se correlacionan directamente con los epítipos y tales determinaciones iniciales de la unión del epítipo se pueden refinar y confirmar aún más mediante otra metodología reconocida en la técnica como se describe en este documento. Sin embargo, como se explica y se muestra en los Ejemplos a continuación, la asignación empírica de moduladores de anticuerpos a agrupaciones individuales proporciona una información que puede ser indicativa del potencial terapéutico de los moduladores descritos.

Más específicamente, se puede determinar si un anticuerpo de referencia seleccionado (o un fragmento del mismo) se une al mismo epítipo o compite de manera cruzada por la unión con un segundo anticuerpo del ensayo (es decir, está en el mismo agrupamiento) utilizando métodos conocidos en la técnica e indicados en los Ejemplos de este documento. En un caso, un modulador de anticuerpo de referencia está asociado con un antígeno DLL3 en condiciones de saturación y luego se determina la capacidad de un modulador de anticuerpo secundario o del ensayo para unirse a DLL3, utilizando técnicas inmunológicas convencionales. Si el anticuerpo del ensayo es capaz de unirse sustancialmente a DLL3 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-DLL3 de referencia, entonces el anticuerpo secundario o del ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo primario o de referencia. Sin embargo, si el anticuerpo del ensayo no es capaz de unirse sustancialmente a DLL3 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo del ensayo se une al mismo epítipo, a un epítipo solapante o a un epítipo que está muy cerca (al menos estéricamente) del epítipo al que se une con el anticuerpo primario. Es decir, el anticuerpo del ensayo compite por la unión al antígeno y está en el mismo agrupamiento que el anticuerpo de referencia.

El término "competir" o "anticuerpo competidor" cuando se usa en el contexto de los moduladores descritos, significa una competencia entre anticuerpos según lo determinado por un ensayo en el que un anticuerpo del ensayo o un fragmento inmunológicamente funcional sometido a prueba, evita o inhibe una unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común. Normalmente, ese ensayo implica el uso de un antígeno purificado (por ejemplo, DLL3 o un dominio o un fragmento del mismo), unido a una superficie sólida o a células portadoras de cualquiera de ellos, una inmunoglobulina sin marcar del ensayo y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina del ensayo. Por lo general, la inmunoglobulina del ensayo está presente en exceso y/o se permite que se una primero. Los anticuerpos identificados por ensayos de competencia (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente, suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar un impedimento estérico. Detalles adicionales con respecto a los métodos para determinar una unión competitiva se proporcionan en los Ejemplos de este documento. Generalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos un 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algunos casos, la unión se inhibe al menos en un 80%, 85%, 90%, 95% o 97% o más.

A la inversa, cuando el anticuerpo de referencia está unido, preferiblemente inhibirá la unión de un anticuerpo del ensayo añadido posteriormente (es decir, un modulador de DLL3) en al menos 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algún caso, la unión del anticuerpo del ensayo se inhibe en al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 97% o más.

Con respecto a la presente invención, y tal y como se expone en los Ejemplos a continuación, se ha determinado (mediante resonancia de plasmón de superficie o interferometría de bio-capas) que el dominio extracelular de DLL3 define al menos nueve agrupaciones mediante unión competitiva, denominadas "agrupación A" a "agrupación I" en este documento. Dada la resolución proporcionada por las técnicas de agrupamiento de moduladores, se cree que estas nueve agrupaciones comprenden la mayoría de las agrupaciones que están presentes en la región extracelular de la proteína DLL3.

A este respecto, y tal como se conoce en la técnica y se detalla en los Ejemplos a continuación, los datos deseados de agrupamiento o de unión competitiva se pueden obtener usando radioensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), ensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA o ELISA), ensayo de competencia de tipo sándwich, un sistema Biacore™ 2000 (es decir, resonancia de plasmón de superficie - GE Healthcare), un anali-

zador ForteBio® (es decir, interferometría de bio-capa - ForteBio, Inc.) o metodología de citometría de flujo. La expresión "resonancia de plasmón superficial", tal y como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones específicas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensores. La expresión "interferometría de bio-capa" se refiere a una técnica analítica óptica que analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en la punta de un biosensor y una capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un desplazamiento del patrón de interferencia que se puede medir en tiempo real. En casos particularmente preferidos, el análisis (ya sea la resonancia de plasmón de superficie, la interferometría de bio-capa o la citometría de flujo) se realiza utilizando un instrumento Biacore o ForteBio o un citómetro de flujo (por ejemplo, FACSaria II) como se demuestra en los siguientes Ejemplos.

Con el fin de caracterizar adicionalmente los epítomos que se asocian o se unen con los moduladores de anticuerpos de DLL3 descritos, se realizó el cartografiado de epítomos a nivel de dominio utilizando una modificación del protocolo descrito por Cochran et al. (J. Immunol Methods. 287 (1-2): 147-158 (2004)). En pocas palabras, los dominios individuales de DLL3 que comprendían secuencias de aminoácidos específicas se expresaron en la superficie de levaduras y la unión con cada anticuerpo de DLL3 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se describen a continuación en el Ejemplo 6 y se muestran en la FIG. 4.

Otras técnicas de cartografiado de epítomos compatibles incluyen mutantes de rastreo de alanina, transferencias de péptidos (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248:443-63), o análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos como la escisión de epítomos, la extracción de epítomos y la modificación química de antígenos (Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496). En otras realizaciones, el perfil asistido por modificación (MAP), también conocido como el perfil de un anticuerpo basado en la estructura del antígeno (ASAP), proporciona un método que clasifica grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo frente a las superficies de antígenos modificados química o enzimáticamente (documento U.S.P.N. 2004/0101920). Cada categoría puede reflejar un epítipo único o bien distinto o parcialmente solapado con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite una depuración rápida de anticuerpos genéticamente idénticos, de modo que la caracterización puede centrarse en anticuerpos genéticamente distintos. Se apreciará que MAP se puede usar para clasificar los moduladores de anticuerpos de hDLL3 de la descripción en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítomos.

Los agentes útiles para alterar la estructura del antígeno inmovilizado incluyen enzimas tales como enzimas proteolíticas (por ejemplo, tripsina, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Asp-N, quimotripsina, etc.). Los agentes útiles para alterar la estructura del antígeno inmovilizado también pueden ser agentes químicos, como ésteres de succinimidilo y sus derivados, compuestos que contienen aminas primarias, hidrazinas y carbohidrazinas, aminoácidos libres, etc.

La proteína antigénica se puede inmovilizar sobre las superficies de chips biosensores o perlas de poliestireno. Estas últimas se pueden procesar, por ejemplo, con un ensayo tal como el ensayo de detección múltiple LUMINEX™ (Luminex Corp.). Debido a la capacidad de LUMINEX para manejar análisis múltiples con hasta 100 tipos diferentes de perlas, LUMINEX proporciona superficies de antígenos casi ilimitadas con varias modificaciones, lo que da como resultado una mejor resolución del perfilado de epítomos de anticuerpos en un ensayo de biosensor.

e. Afinidad de la unión

Además de la especificidad del epítipo, los anticuerpos descritos se pueden caracterizar usando características físicas tales como, por ejemplo, afinidades de la unión. A este respecto, la presente descripción incluye además el uso de anticuerpos que tienen una afinidad de unión elevada hacia una o varias isoformas de DLL3 o, en el caso de pan-anticuerpos, más de un miembro de la familia DLL. Tal y como se usa en este documento, la expresión "afinidad elevada" hacia un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente de 10^{-9} M o menos y aún más preferiblemente de 10^{-10} M o menos hacia un antígeno diana. Sin embargo, una unión de "afinidad elevada" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "afinidad elevada" hacia un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, más preferiblemente de 10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente de 10^{-9} M o menos.

El término " K_D ", tal y como se usa en este documento, se entiende que se refiere a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Se dice que un anticuerpo de la descripción se une de forma inespecífica a su antígeno diana cuando la constante de disociación K_D (k_{off}/k_{on}) es $\leq 10^{-7}$ M. El anticuerpo se une específicamente al antígeno con una afinidad elevada cuando la K_D es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, y con una afinidad muy elevada cuando la K_D es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una realización de la invención, el anticuerpo tiene una K_D de $\leq 10^{-9}$ M y una tasa de disociación de aproximadamente 1×10^{-4} /segundo. En una realización de la invención, la tasa de disociación es $< 1 \times 10^{-5}$ /segundo. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos se unirán a DLL3 con una K_D de entre aproximadamente 10^{-7} M y 10^{-10} M, y en otra realización más se unirán con una $K_D \leq 2 \times 10^{-10}$ M. Otros casos seleccionados de la presente descripción comprenden anticuerpos que tienen una constante de disociación o K_D (k_{off}/k_{on}) de menos de 10^{-2} M, menos de 5×10^{-2} M, menos de 10^{-3} M, menos de 5×10^{-3} M, menos de 10^{-4} M, menos de 5×10^{-4} M, menos de 10^{-5} M, menos de 5×10^{-5} M, menos de 10^{-6} M, menos de 5×10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 5×10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 5×10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 5×10^{-10} M,

menos de 10^{-11} M, menos de 5×10^{-11} M, menos de 10^{-12} M, menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-15} M o menos de 5×10^{-15} M.

5 En casos específicos, un anticuerpo de la descripción que se une inmunoespecíficamente a DLL3 tiene una constante de tasa de asociación o tasa k_{on} (o k_a) (DLL3 (Ab) + antígeno (Ag) $^{k_{on} \leftarrow}$ Ab-Ag) de al menos 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 2×10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 5×10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 5×10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$, al menos 5×10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ o al menos 10^8 M $^{-1}$ s $^{-1}$.

10 En otro caso, un anticuerpo de la descripción que se une inmunoespecíficamente a DLL3 tiene una constante de tasa de disociación o tasa k_{off} (o k_d) (DLL3 (Ab) + antígeno (Ag) $^{k_{off} \leftarrow}$ Ab-Ag) de menos de 10^{-1} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-1} s $^{-1}$, menos de 10^{-2} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-2} s $^{-1}$, menos de 10^{-3} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-3} s $^{-1}$, menos de 10^{-4} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-4} s $^{-1}$, menos de 10^{-5} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-5} s $^{-1}$, menos de 10^{-6} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-6} s $^{-1}$, menos de 10^{-7} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-7} s $^{-1}$, menos de 10^{-8} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-8} s $^{-1}$, menos de 10^{-9} s $^{-1}$, menos de 5×10^{-9} s $^{-1}$ o menos de 10^{-10} s $^{-1}$.

15 En otras realizaciones seleccionadas de la presente invención, los anticuerpos anti-DLL3 tendrán una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de al menos 10^2 M $^{-1}$, al menos 5×10^2 M $^{-1}$, al menos 10^3 M $^{-1}$, al menos 5×10^3 M $^{-1}$, al menos 10^4 M $^{-1}$, al menos 5×10^4 M $^{-1}$, al menos 10^5 M $^{-1}$, al menos 5×10^5 M $^{-1}$, al menos 10^6 M $^{-1}$, al menos 5×10^6 M $^{-1}$, al menos 10^7 M $^{-1}$, al menos 5×10^7 M $^{-1}$, al menos 10^8 M $^{-1}$, al menos 5×10^8 M $^{-1}$, al menos 10^9 M $^{-1}$, al menos 5×10^9 M $^{-1}$, al menos 10^{10} M $^{-1}$, al menos 5×10^{10} M $^{-1}$, al menos 10^{11} M $^{-1}$, al menos 5×10^{11} M $^{-1}$, al menos 10^{12} M $^{-1}$, al menos 5×10^{12} M $^{-1}$, al menos 10^{13} M $^{-1}$, al menos 5×10^{13} M $^{-1}$, al menos 10^{14} M $^{-1}$, al menos 5×10^{14} M $^{-1}$, al menos 10^{15} M $^{-1}$ o al menos 5×10^{15} M $^{-1}$.

20 Además de las características moduladoras mencionadas anteriormente, los anticuerpos de la presente descripción se pueden caracterizar adicionalmente usando características físicas adicionales que incluyen, por ejemplo, una estabilidad térmica (es decir, temperatura de fusión; T_m) y puntos isoeléctricos. (Véase, por ejemplo, Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14:1023; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78: 394-404; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154).

V. Conjugados de anticuerpo y fármaco y restos de fármaco y enlazador

25 Se apreciará que los conjugados de DLL3 de la presente invención comprenden un agente de unión celular a DLL3 enlazado covalentemente a través de un resto enlazador a una carga útil de fármaco PBD. Tal y como se analiza en el presente documento, los conjugados de DLL3 de la presente descripción se pueden usar para proporcionar una cualquiera de PBD 1, PBD 2, PBD 3, PBD 4 o PBD 5 en la ubicación diana (por ejemplo, células tumorígenas). Esto se logra ventajosamente mediante los ADCs descritos que dirigen la carga útil de fármaco unida al sitio diana en un estado relativamente no reactivo y no tóxico antes de liberar y activar la carga útil de fármaco. Esta liberación dirigida de la carga útil tóxica se logra en gran medida a través de los enlazadores incorporados en los compuestos de fármaco y enlazador DL 1 - 5 que se producen de modo que no se escindan y liberen la PBD dímera citotóxica hasta que el ADC haya alcanzado la célula tumorígena. Esto proporciona ventajosamente niveles relativamente altos del fármaco PBD activo en el sitio del tumor, minimizando la exposición de células y tejidos no diana.

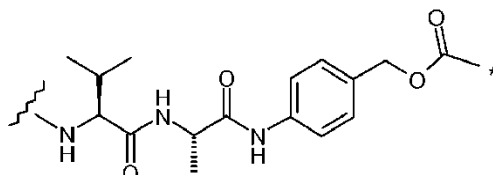
1. Compuestos enlazadores

35 Más particularmente, los enlazadores incorporados en los ADCs descritos son preferiblemente estables extracelularmente, evitan la agregación de moléculas de ADC y mantienen el ADC de forma soluble libre en medios acuosos y en un estado monomérico. Antes del transporte o el suministro en una célula, el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) es preferiblemente estable y permanece intacto, es decir, el anticuerpo permanece unido al resto de fármaco. Aunque los enlazadores son estables fuera de la célula diana, están diseñados para ser escindidos con una tasa eficaz dentro de la célula. Por consiguiente, un enlazador efectivo: (i) mantendrá las propiedades de unión específica del anticuerpo; (ii) permitirá la administración intracelular del conjugado o del resto de fármaco; (iii) permanecerá estable e intacto, es decir, no escindido, hasta que el conjugado se haya entregado o transportado a su sitio diana; y (iv) mantendrá un efecto citotóxico, que destruye las células o un efecto citostático del resto de fármaco PBD. La estabilidad del ADC se puede medir mediante técnicas analíticas convencionales, como la espectroscopia de masas, HPLC y la técnica de separación/análisis LC/MS. La fijación covalente del anticuerpo y el resto de fármaco requiere que el enlazador tenga dos grupos funcionales reactivos, es decir, bivalencia en un sentido reactivo. Se conocen reactivos enlazadores bivalentes que son útiles para fijar dos o más restos funcionales o biológicamente activos, tales como péptidos, ácidos nucleicos, fármacos, toxinas, anticuerpos, haptenos y grupos informadores, y se han descrito métodos que dan como resultado conjugados (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242).

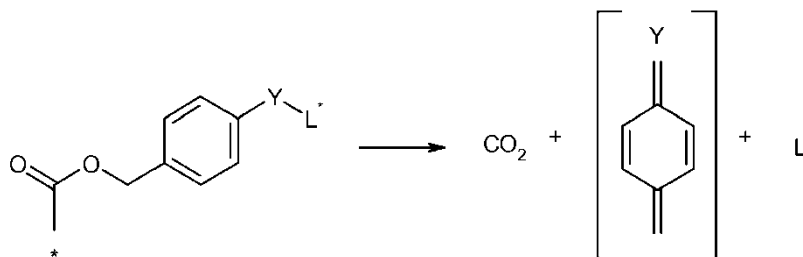
55 Para este fin, los ADCs de DLL3 de la invención comprenden enlazadores que se pueden escindir con un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o un endosoma o caveola). En el caso de los ADCs 1 - 5, el enlazador comprende un enlazador peptídico que se escinde con una enzima peptidasa o proteasa intracelular, que incluye, pero sin limitarse a, una proteasa lisosómica o endosómica. En ciertas realizaciones, el enlazador peptídico tiene preferiblemente al menos dos aminoácidos de longitud o en otras realizaciones tiene al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir cathepsinas B y D y plasmina, cada una de las cuales se sabe que hidroliza derivados de fármacos dipéptidos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana. En los restos de fármaco y enlazador descritos, DL1 - DL5,

el enlazador peptídico escindible con una proteasa intracelular es un resto dipéptido de valina-alanina. Una ventaja de usar una liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa normalmente cuando está conjugado y las estabildades en suero de los conjugados son normalmente altas.

- 5 Además de la unidad dipeptídica escindible de la enzima, los enlazadores descritos en los ADCs 1 - 5 (o DL1 - DL5) incluyen cada uno una unidad espaciadora, un resto de unión para conectar el fármaco y el enlazador con el agente de unión celular y, al menos en el caso de DL4 y DL5, un resto autoinmolativo que proporciona la desconexión limpia del fármaco PBD después de la escisión del enlazador. Con respecto al grupo autoinmolativo, tanto DL4 como DL5 incorporan el mismo resto. Para ello, el enlazador autoinmolativo y el dipéptido forman juntos el grupo -NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-, que se ilustra a continuación:



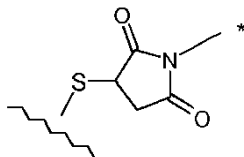
- 10 en donde el asterisco indica el punto de fijación al resto citotóxico PBD seleccionado, y la línea ondulada indica el punto de fijación a la porción restante del enlazador (por ejemplo, los segmentos que se unen al espaciador-anticuerpo) que se pueden conjugar con el anticuerpo. Después de la escisión enzimática del dipéptido, el enlazador autoinmolativo permitirá una liberación limpia del compuesto protegido (es decir, el dímero de PBD tóxico) cuando se activa un sitio remoto, siguiendo las líneas que se muestran a continuación:



en donde L* es la forma activada de la porción restante del enlazador que comprende la unidad peptídica ahora escindida. La liberación limpia de PBD 4 y PBD 5 asegura que conservarán la actividad tóxica deseada.

- 20 Como se explicará con más detalle a continuación y se expondrá en el Ejemplo 7, los enlazadores de fármaco de la presente invención se unirán a nucleófilos de tiol reactivos. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante un tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. El documento U.S.P.N. 7.521.541 describe anticuerpos modificados genéticamente mediante la introducción de aminoácidos reactivos con cisteína.

- 25 En DL 1, DL 2, DL 3 y DL 5, la conexión entre el agente de unión celular y el resto de fármaco y enlazador es a través de un residuo de tiol del agente de unión celular y un grupo maleimida terminal presente en el enlazador. En tales casos, la conexión entre el agente de unión celular y el fármaco y enlazador es:



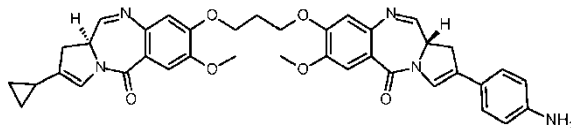
- 30 en donde el asterisco indica el punto de fijación a la porción restante del fármaco y enlazador y la línea ondulada indica el punto de fijación a la porción restante del agente de unión celular. En ese caso, el átomo de S se deriva normalmente del anticuerpo de DLL3.

- 35 Con respecto a DL4, el resto de unión comprende una yodoacetamida terminal que puede reaccionar con tioles activados para proporcionar el ADC 4 deseado. Como se expone en el Ejemplo 7 a continuación, el procedimiento de conjugación preferido para DL4 es ligeramente diferente del procedimiento de conjugación preferido para el grupo de unión de maleimida encontrado en otros casos. En cualquier caso, un experto en la técnica podría conjugar fácilmente cada uno de los compuestos de fármaco y enlazador descritos con un modulador de DLL3 compatible ante la presente descripción.

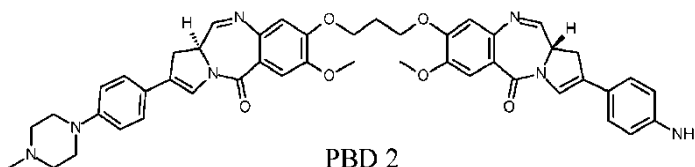
2. Compuestos de PBD

Como se ha descrito anteriormente y presentado en los Ejemplos a continuación, cada uno de los compuestos de

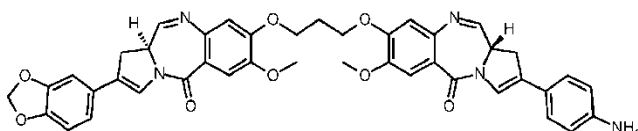
5 PBD descritos (representados inmediatamente a continuación) muestra propiedades citotóxicas que lo convierten en un candidato potencial para incorporarse en los ADCs de la presente descripción. La síntesis de cada una de PBD 1 - 5 como un componente de cada DL 1 - 5, se presenta con gran detalle en el Ejemplo 1 a continuación. En vista de la presente descripción, los compuestos tóxicos que comprenden las cargas útiles de los ADCs de la presente descripción se podrían generar y emplear fácilmente como se expone en el presente documento. Los compuestos de PBD que se liberan de los ADCs 1 - 5 después de la escisión del enlazador, se indican a continuación:



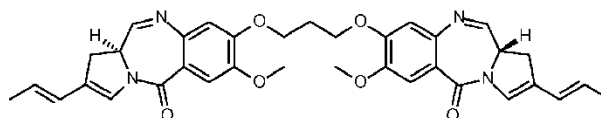
PBD 1



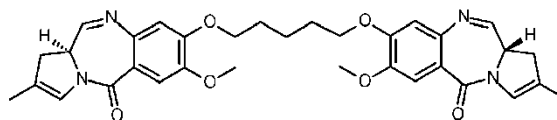
PBD 2



PBD 3



PBD 4



PBD 5

10

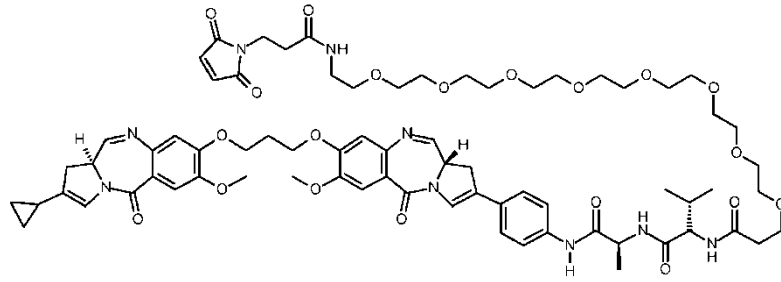
15

El suministro y la liberación de tales compuestos en el sitio o los sitios de un tumor pueden ser clínicamente eficaces en el tratamiento o el control de trastornos proliferativos de acuerdo con la presente descripción. Con respecto a los compuestos, se apreciará que cada una de las PBDs descritas tiene dos centros sp^2 en cada anillo C, lo que puede permitir una unión más fuerte en el surco menor del ADN (y, por lo tanto, una mayor toxicidad), que en los compuestos con un solo centro sp^2 en cada anillo C. Por lo tanto, cuando se usan en los ADCs de DLL3 como se establece en el presente documento, las PBDs descritas pueden demostrar ser particularmente eficaces para el tratamiento de trastornos proliferativos.

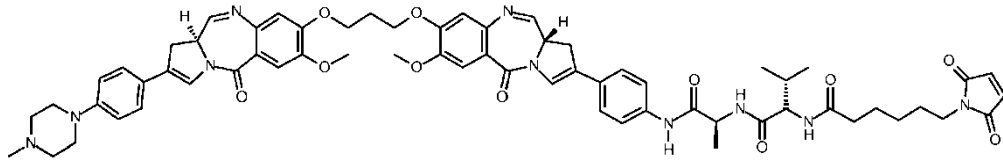
3. Restos de fármaco y enlazador

20

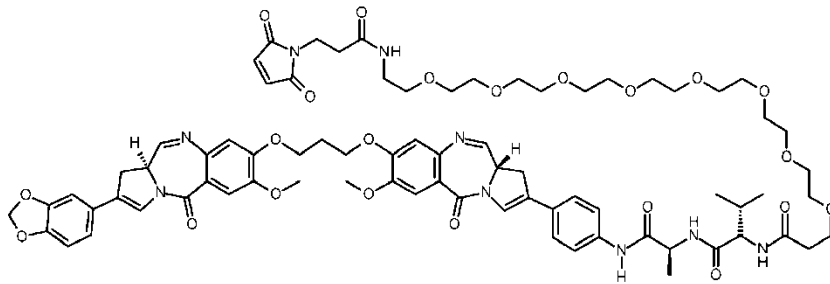
De acuerdo con las enseñanzas de este documento, las PBDs descritas se combinarán con enlazadores como se ha descrito anteriormente para proporcionar los compuestos de fármaco y enlazador, DL1 - DL5, como se indica inmediatamente a continuación. Los protocolos detallados para la síntesis de cada uno de los fármacos y enlazadores descritos se exponen en el Ejemplo 1 a continuación.



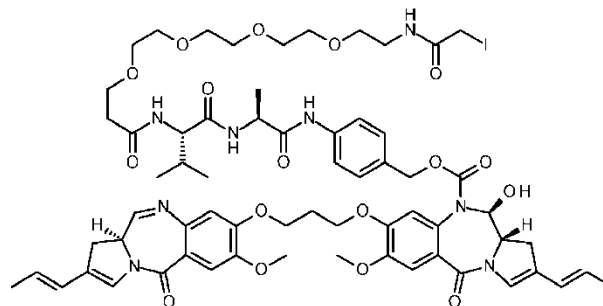
DL1



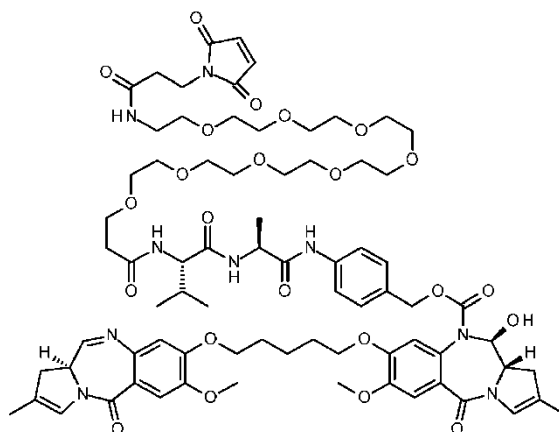
DL2



DL3



DL4



DL5

Con respecto a los fármacos y enlazadores DL 1 - 5, se apreciará que DL 1, DL 2, DL 3 y DL 5 comprenden cada uno un grupo maleimida terminal que se puede usar para conjugar los compuestos con los anticuerpos de DLL3 seleccionados. A la inversa, DL 4 comprende un grupo yodoacetamida terminal que se usa para conjugar la carga útil de PBD con el anticuerpo dirigido. Puede ser que, bajo ciertas condiciones, el uso de un resto yodoacetamida evite ciertas reacciones secundarias no deseadas y proporcione una mayor estabilidad al ADC. Además, se apreciará que DL 4 y DL 5 comprenden PBDs que están unidas al modulador de DLL3 a través de la posición N10 en el anillo B, mientras que DL1, DL2 y DL3 están conectados con el anticuerpo seleccionado a través de la posición C2 en el anillo C. Con respecto a los compuestos que se unen a través de la posición N10, se observará además que los enlazadores comprenden un resto autoinmolativo PABC para asegurar una separación limpia de la carga útil. En vista de las presentes enseñanzas, un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué DL (y ADC asociado) resultaría eficaz para el tratamiento de trastornos proliferativos seleccionados.

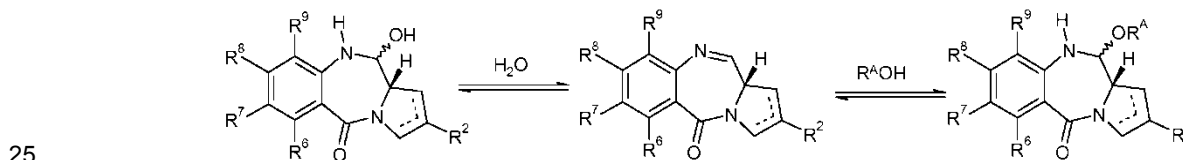
4. Características de los compuestos

Los siguientes casos y variaciones que se exponen inmediatamente a continuación son aplicables a los ADCs, a los enlazadores de fármacos y/o PBDs descritos y se contemplan expresamente como que forman parte del alcance de la presente descripción.

a. Solvatos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o elaborar un solvato correspondiente del enlazador de fármaco, ADC o PBD. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, un compuesto activo, una sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede denominar convenientemente un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

La descripción incluye compuestos en los que se añade un disolvente a través del enlace imina del resto PBD, que se ilustra a continuación, en donde el disolvente es agua o un alcohol ($R^A\text{OH}$, en donde R^A es alquilo C_{1-4}):



Estas formas se pueden denominar las formas carbinolamina y éter de carbinolamina de la PBD (como se describe en la sección relativa a R^{10} más arriba). La igualación de estos equilibrios depende de las condiciones en las que se encuentran los compuestos, así como de la naturaleza del propio resto.

b. Isómeros

Ciertos compuestos de la descripción pueden existir en una o varias formas particulares geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereómeras, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, incluidas, pero no limitadas a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, silla, giro, sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, en lo sucesivo denominadas colectivamente "isómeros" (o "formas isoméricas").

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no poder superponer la pareja de la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se pueden superponer a su pareja de la imagen especular.

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

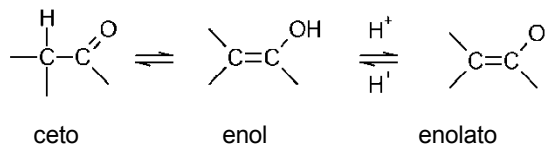
"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, p. ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar con procedimientos analíticos de alta resolución, tales como la electroforesis y la cromatografía.

10 "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

15 Las definiciones y convenciones estereoquímicas utilizadas en este documento generalmente observan a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la descripción pueden contener centros asimétricos o quirales, y por lo tanto existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se entiende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la descripción, incluidas, sin limitarse a, los diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, forman parte de la presente descripción. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se utilizan para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su o sus centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para indicar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, con (-) o l se entiende que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede tener lugar cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

30 Téngase en cuenta que, excepto a como se describe a continuación para las formas tautoméricas específicamente excluidas del término "isómeros", tal y como se usa en este documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De manera similar, una referencia a un orto-clorofenilo, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir formas estructuralmente isoméricas que entren dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

40 La exclusión anterior no se refiere a formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, las siguientes parejas tautoméricas: ceto/enol (ilustradas a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiolo, N-nitroso/hidroxiazolo y nitro/aci-nitro.



45 El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales con diferentes energías que son interconvertibles a través de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protones (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones a través de la migración de un protón, como las isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante la reorganización de algunos de los electrones de la unión.

50 Se debe tener en cuenta que en el término "isómero" se incluyen específicamente los compuestos con una o varias sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹H, ²H (D) y ³H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹²C, ¹³C y ¹⁴C; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹⁶O y ¹⁸O; y similares.

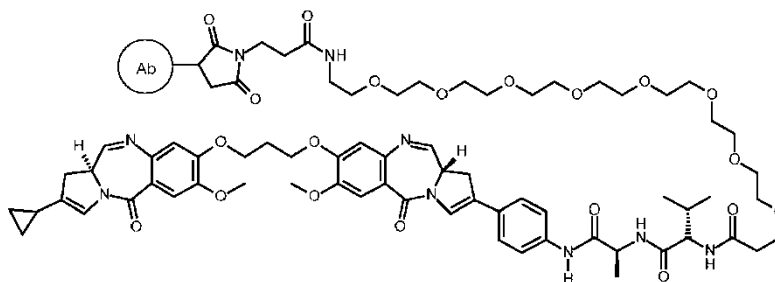
55 Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la descripción incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero que no están limitados a, ²H (deuterio, D), ³H (tritio), ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸F, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl y ¹²⁵I. Diversos compuestos marcados con isótopos de la presente descripción, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H, ¹³C y ¹⁴C. Tales

5 compuestos marcados con isótopos pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios de cinética de reacción, técnicas de detección o de formación de imagen, como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), incluidos los ensayos de distribución en tejidos de fármacos o sustratos, o en el tratamiento radioactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos sustituidos o marcados con deuterio de la descripción pueden tener propiedades mejoradas de DMPK (metabolismo de fármacos y farmacocinética) en relación con la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados, como el deuterio, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que dan lugar a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado con ¹⁸F puede ser útil para estudios PET o SPECT. Los compuestos marcados isotópicamente de esta descripción y los profármacos de los mismos se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los esquemas o en los ejemplos y las preparaciones que se describen a continuación, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo marcado de forma no isotópica. Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ²H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que dan lugar a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente. La concentración de tal isótopo más pesado, específicamente deuterio, se puede definir por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de esta descripción, cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular, se entiende que representa cualquier isótopo estable de ese átomo.

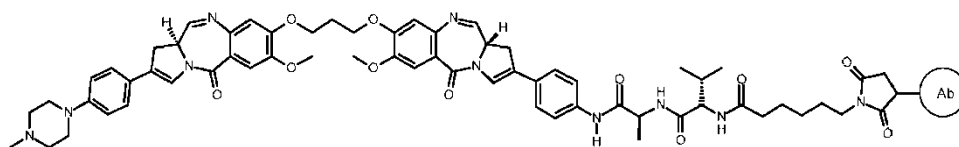
20 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluye todas esas formas isoméricas, incluidas (total o parcialmente) las racémicas y otras mezclas de las mismas. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y la separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente mediante una adaptación de los métodos descritos en este documento o métodos conocidos de una manera conocida.

5. Conjugados y carga de fármaco

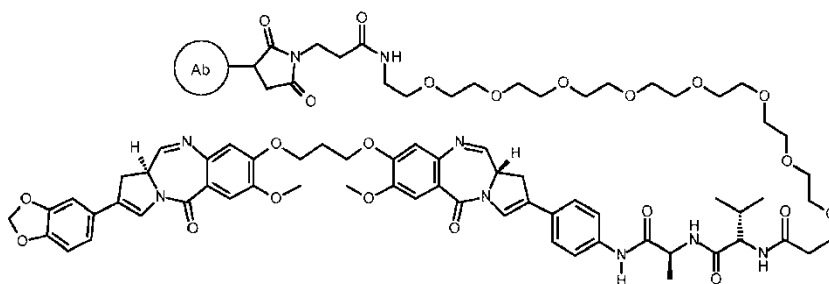
25 Como se ha descrito anteriormente, los siguientes conjugados de anticuerpo y fármaco se proporcionan en la presente descripción:



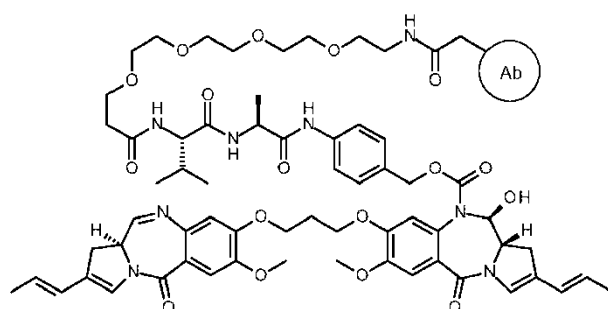
ADC 1



ADC 2

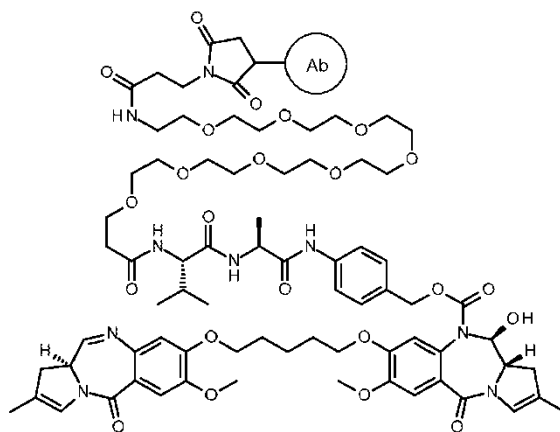


ADC 3



ADC 4

y



ADC 5

- 5 Una vez que los moduladores y los fármacos y enlazadores de la descripción se han generado y/o producido y seleccionado de acuerdo con las enseñanzas de este documento, se pueden enlazar o conjugar para proporcionar los ADCs descritos. Tal y como se usan en el presente documento, los términos "conjugado" o "conjugado de modulador" o "conjugado de anticuerpo" o "conjugado de DLL3" o "ADC" se usarán de manera intercambiable y se entiende que indican cualquiera de ADC 1, ADC 2, ADC 3, ADC 4 o ADC 5. Se pueden usar métodos reconocidos por la
- 10 técnica para conjugar el anticuerpo seleccionado y el fármaco y enlazador para proporcionar el ADC deseado. Los métodos de conjugación preferidos se exponen en el Ejemplo 7 a continuación. Además, variando las condiciones de conjugación conocidas en la técnica o seleccionando estructuras artificiales de anticuerpos particulares, los ADCs que muestran varias relaciones molares estequiométricas de fármaco a anticuerpo, se pueden generar y están expresamente dentro del alcance de la presente invención.
- 15 Más generalmente, los expertos en la técnica apreciarán que están disponibles una variedad de reacciones diferentes para la fijación o la asociación de los fármacos y enlazadores descritos, a los agentes de unión de DLL3. A modo de ejemplo, los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, grupos tiol de cadena lateral, por

ejemplo, cisteína. Los grupos tiol son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de enlazador, tales como los de la presente descripción. Los anticuerpos preferidos de la presente descripción tendrán disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína que proporcionan tales grupos nucleófilos. Por lo tanto, en ciertos casos, la reacción de grupos sulfhidrilo libres de cisteínas moduladoras y los grupos maleimido o yodoacetamida terminales de los fármacos y enlazadores descritos, proporcionará la conjugación deseada. En tales casos, los anticuerpos pueden volverse reactivos para una conjugación con reactivos enlazadores mediante un tratamiento con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o (*tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Cada puente disulfuro de cisteína formará de este modo, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. En otros casos, se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de lisinas con reactivos, incluyendo, pero que no están limitados a, 2-iminotiolano (reactivo de Traut), SATA, SATP o SAT(PEG)₄, que dan como resultado la conversión de una amina en un tiol. Si bien se prefieren tales reactivos, se apreciará que la conjugación de los enlazadores de fármacos y los moduladores de DLL3 descritos se puede efectuar usando diversas reacciones, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica que proporcionan un enlace covalente de un grupo nucleófilo de un anticuerpo o un agente de unión celular con un reactivo de fármaco y enlazador. Como se indica, los métodos particularmente preferidos se exponen con más detalle en el Ejemplo 7 a continuación.

Los ADCs y las composiciones de ADC de la invención pueden comprender restos de fármaco y de anticuerpo en diversas relaciones molares estequiométricas que dependen, al menos en parte, del método usado para efectuar la conjugación. Tal y como se usa en el presente documento, las relaciones molares estequiométricas se definen en términos de "relaciones de fármaco a anticuerpo", "DAR" (del inglés, Drug to Antibody Ratios) o "carga de fármaco". Dicho de otra manera, la carga del fármaco o DAR es el número promedio ponderado de fármacos de PBD por agente de unión celular, p. ej., un anticuerpo en la composición. Cuando los compuestos de PBD de la descripción se conjugan con cisteínas de origen natural en IgG1, la carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos por agente de unión celular, es decir, cuando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 restos de fármaco se fijan covalentemente a cada agente de unión celular. Preferiblemente, la DAR de las composiciones de la presente invención será de aproximadamente 2, 4 o 6 y, en realizaciones particularmente preferidas, la DAR comprenderá aproximadamente 2.

Más específicamente, las composiciones conjugadas de la presente descripción comprenden agentes de unión celular, p. ej., anticuerpos, conjugados con una gama de compuestos de PBD, de 1 a 8 (en el caso de una IgG1). Como tales, las composiciones de conjugado de anticuerpo y fármaco descritas incluyen mezclas de compuestos de conjugados de anticuerpo y fármaco, en donde la mayoría de los anticuerpos constituyentes están unidos covalentemente a uno o varios restos de fármaco PBD y en donde los restos de fármaco se pueden fijar al anticuerpo en diversos residuos de aminoácidos. Es decir, después de la conjugación, las composiciones de ADC de la invención comprenderán una mezcla de conjugados de DLL3 con diferentes cargas de fármaco (por ejemplo, de 1 a 8 fármacos por anticuerpo IgG1) con diversas concentraciones. Usando condiciones de conjugación selectivas y métodos de purificación, las composiciones de conjugado se pueden dirigir al punto en el que contienen en gran parte una sola especie de ADC deseada predominante (por ejemplo, con una carga de fármaco de 2) con niveles relativamente bajos de otras especies de ADCs (por ejemplo, con una carga de fármaco de 1, 4, 6, etc.). El valor de DAR representa el promedio ponderado de la carga de fármaco para la composición en su conjunto (es decir, todas las especies de ADC tomadas juntas). Debido a la incertidumbre inherente en la metodología de la cuantificación empleada y la dificultad para eliminar completamente las especies de ADC no predominantes en un entorno comercial, los valores o especificaciones aceptables de DAR se presentan a menudo como un intervalo o una distribución (es decir, una DAR de 2 +/- 0,5). Preferiblemente, las composiciones que comprenden una DAR medida dentro del intervalo (es decir, 1,5 a 2,5) se usarían en un entorno farmacéutico.

Por tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la presente invención comprenderá composiciones que tienen una DAR de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 cada una +/- 0,4. En otras realizaciones preferidas, la presente invención comprenderá una DAR de 2, 4, 6 u 8 +/- 0,4. Finalmente, en realizaciones preferidas seleccionadas, la presente invención comprenderá una DAR de 2 +/- 0,4. Se apreciará que el intervalo o la desviación puede ser inferior a 0,4 en ciertas realizaciones preferidas. Por tanto, en otras realizaciones, las composiciones comprenderán una DAR de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 cada una +/- 0,3, una DAR de 2, 4, 6 u 8 +/- 0,3 o incluso más preferiblemente una DAR de 2 +/- 0,3. En otras realizaciones, las composiciones de conjugado de IgG1 comprenderán preferiblemente una composición con una DAR de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 cada una +/- 0,4 y niveles relativamente bajos (es decir, menos del 30%) de especies de ADC no predominantes. En otras realizaciones preferidas, la composición de ADC comprenderá una DAR de 2, 4, 6 u 8 cada una +/- 0,4 con niveles relativamente bajos (<30%) de especies de ADC no predominantes. En realizaciones particularmente preferidas, la composición de ADC comprenderá una DAR de 2 +/- 0,4 con niveles relativamente bajos (<30%) de especies de ADC no predominantes.

La distribución de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopia de masas, ensayo ELISA y electroforesis. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de fármacos por anticuerpo. Mediante un ELISA, se puede determinar el valor promedio de los fármacos por anticuerpo en una preparación particular de ADC (Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores de fármaco por anticuerpo no es discernible por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección del ELISA. Además, el ensayo ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina dónde se fijan los restos de fármaco al anticuerpo,

como los fragmentos de cadena pesada o de cadena ligera, o los residuos de aminoácidos particulares. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de un ADC homogéneo en el que la DAR comprende un cierto valor bien definido del ADC con otras cargas de fármaco, se puede lograr por medio de HPLC de fase inversa o electroforesis. Tales técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

5 Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un compuesto intermediario de fármaco y enlazador, o un reactivo enlazador seguido de un reactivo del resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos ADCs con una distribución de restos de fármaco fijados a un anticuerpo, p. ej., 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida, como la fase inversa polimérica (PLRP) y la interacción hidrófoba (HIC),
10 pueden separar los compuestos en la mezcla por el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un solo valor de carga de fármaco se pueden aislar, sin embargo, esos ADCs de valor de carga único aún pueden comprender mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco se pueden fijar, a través del enlazador, en diferentes sitios en el anticuerpo.

15 Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, la cantidad de carga de fármaco puede estar limitada por la cantidad de sitios de fijación en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede fijar un enlazador. Una carga de fármaco mayor, por ejemplo >5, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

20 Normalmente, menos del máximo teórico de los restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco y enlazador o el reactivo enlazador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con amina. Además, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con tiol. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos, si es que contienen alguno, que pueden estar unidos a un resto de fármaco. La mayoría de los residuos tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos, se encuentran como puentes disulfuro y se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, en condiciones de reducción parcial o total. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitar el exceso molar del producto intermedio de fármaco y enlazador o de reactivo enlazador en relación con el anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de la cisteína.

30 Además, se apreciará que los grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o en un fragmento del mismo) mediante una modificación genética de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o varios residuos de aminoácidos de cisteína no naturales). Es decir, los aminoácidos de cisteína se pueden modificar genéticamente en sitios reactivos en un anticuerpo y no formar enlaces disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Los tioles de cisteína modificados genéticamente pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los reactivos de fármaco y enlazador de la presente descripción que tienen grupos electrofílicos reactivos con tiol, tales como maleimida o alfa-yodo amidas, para formar un ADC con anticuerpos modificados genéticamente con cisteína y los restos de fármacos PBD. La ubicación del resto de fármaco puede, por lo tanto, diseñarse, controlarse y conocerse. La carga del fármaco se puede controlar ya que los grupos tiol de cisteína modificados genéticamente reaccionan normalmente con reactivos enlazadores reactivos con tiol o reactivos de fármaco y enlazador con un rendimiento elevado. La modificación genética de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido cisteína mediante sustitución en un solo sitio en la cadena pesada o ligera, proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Se puede lograr una carga de fármaco cercana a 2 casi con homogeneidad del ADC del producto de la conjugación.

45 **VI. Preparaciones farmacéuticas y usos terapéuticos**

1. Formulaciones y vías de administración

Dependiendo de la forma del conjugado seleccionado, el modo de administración previsto, la enfermedad que se está tratando o realizando un seguimiento y muchas otras variables, las composiciones de la invención se pueden formular según se desee utilizando métodos reconocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar puras o con un mínimo de componentes adicionales, mientras que otras se pueden formular opcionalmente para contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20ª ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª ed., Pharmaceutical Press (2000)). Diversos vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes se pueden obtener fácilmente a partir de diversas fuentes comerciales. Además, también está disponible una variedad de sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares. Ciertos vehículos ejemplares no limitativos incluyen solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

Más particularmente, se apreciará que, en algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar puras o con un mínimo de componentes adicionales. A la inversa, los ADCs de DLL3 de la presente invención se pueden formular opcionalmente para contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que son bien conocidos en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración del conjugado o que ayudan al procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que están optimizadas farmacéuticamente para ser entregadas en el sitio de acción. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia o actuar como un diluyente para mejorar la farmacocinética o la estabilidad del ADC. Los excipientes o aditivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para una osmolaridad variable, agentes de encapsulación, tampones y mejoradores de la penetración en la piel. En ciertas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma liofilizada y reconstituida, por ejemplo, en solución salina tamponada antes de la administración. Esas composiciones reconstituidas se administran preferiblemente por vía intravenosa.

Los ADCs descritos para una administración sistémica se pueden formular para una administración entérica, parenteral o tópica. De hecho, los tres tipos de formulación se pueden usar simultáneamente para lograr una administración sistémica del ingrediente activo. Los excipientes, así como las formulaciones para una administración parenteral y no parenteral de fármacos, se exponen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a ed. Mack Publishing (2000). Las formulaciones adecuadas para una administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, se pueden administrar suspensiones de los compuestos activos, según sea apropiado, para suspensiones oleosas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, poli(láctida) sustituida con hexilo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. Los liposomas también se pueden usar para encapsular el agente para su administración en la célula.

Las formulaciones adecuadas para administración entérica incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos recubiertos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y formas de liberación controlada de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección), incluyen líquidos estériles acuosos o no acuosos, isotónicos, exentos de pirógenos (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el ingrediente activo se disuelve, se suspende o se proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, agentes bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre (u otro líquido corporal relevante) del receptor deseado. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para usar en tales formulaciones, incluyen inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer o inyección de Ringer con lactato.

Las formulaciones compatibles para una administración parenteral (por ejemplo, una inyección intravenosa) comprenderán concentraciones de ADC de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En ciertas realizaciones seleccionadas, las concentraciones de ADC comprenderán 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml o 1 mg/ml. En otras realizaciones preferidas, las concentraciones de ADC comprenderán 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml, 14 mg/ml, 16 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

En general, los compuestos y las composiciones de la descripción, que comprenden ADCs de DLL3, se pueden administrar *in vivo*, a un sujeto que lo necesite, a través de varias vías, que incluyen, sin limitarse a, la oral, la intravenosa, la intraarterial, la subcutánea, la parenteral, la intranasal, la intramuscular, la intracraneal, la intracardiaca, la intraventricular, la intratraqueal, la bucal, la rectal, la intraperitoneal, la intradérmica, la tópica, la transdérmica y la intratecal, o de otro modo mediante implantación o inhalación. Las composiciones objeto se pueden formular en preparaciones de forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa; incluyendo, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhalantes y aerosoles. La formulación apropiada y la vía de administración se pueden seleccionar de acuerdo con la aplicación prevista y el régimen terapéutico. En realizaciones particularmente preferidas, los compuestos de la presente descripción se administrarán por vía intravenosa.

2. Dosificaciones

De manera similar, el régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el momento de la administración y la repetición, dependerá del individuo en particular y de su historial médico, así como de consideraciones empíricas tales como la farmacocinética (por ejemplo, la semivida, la tasa de aclaramiento, etc.). La frecuencia de la administración se puede determinar y ajustar a lo largo del curso de la terapia, y se basa en reducir el número de células proliferativas o tumorígenas, mantener la reducción de tales células neoplásicas, reducir la proliferación de células neoplásicas o retrasar el desarrollo de una metástasis. En otras realizaciones, la dosificación administrada se puede

ajustar o atenuar para controlar los posibles efectos secundarios y/o la toxicidad. Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de una composición terapéutica objeto.

Un experto en la técnica apreciará que las dosificaciones apropiadas del compuesto de conjugado, y las composiciones que comprenden el compuesto de conjugado, pueden variar de un paciente a otro. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen, pero no se limitan a, la actividad del compuesto particular, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación, la gravedad de la afección y la especie, el sexo, la edad, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente. La cantidad de compuesto y la vía de administración serán finalmente según el criterio del médico, veterinario o médico clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que logren el efecto deseado sin causar daños sustanciales o efectos secundarios perjudiciales.

En general, los ADCs de la invención se pueden administrar con diversos intervalos. Estos incluyen aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis; aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis; aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. Otros intervalos incluyen aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis y aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En ciertas realizaciones, la dosificación es de al menos aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

En realizaciones seleccionadas, los ADCs se administrarán (preferiblemente por vía intravenosa) a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 µg/kg de peso corporal por dosis. Otras realizaciones comprenderán la administración de ADCs a aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 µg/kg de peso corporal por dosis. En otros casos preferidos, los conjugados descritos se administrarán a 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 9 o 10 mg/kg. En todavía otras realizaciones, los conjugados se pueden administrar a 12, 14, 16, 18 o 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En todavía otras realizaciones, los conjugados se pueden administrar a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 o 100 mg/kg de peso corporal por dosis. Con las enseñanzas de este documento, un experto en la técnica podría determinar fácilmente las dosificaciones apropiadas para diversos ADCs, basándose en estudios preclínicos en animales, observaciones clínicas y técnicas y mediciones médicas y bioquímicas convencionales. En realizaciones particularmente preferidas, tales dosificaciones de conjugado de DLL3 se administrarán por vía intravenosa durante un período de tiempo. Además, tales dosificaciones se pueden administrar varias veces a lo largo de un curso de tratamiento definido.

Otros regímenes de dosificación se pueden basar en los cálculos del Área de Superficie Corporal (BSA, por sus siglas en inglés) como se describe en el documento U.S.P.N. 7.744.877. Como es bien sabido, el BSA se calcula utilizando la altura y el peso del paciente y proporciona una medida del tamaño del sujeto representado por el área de superficie de su cuerpo. En ciertas realizaciones, los conjugados se pueden administrar en dosificaciones de 1 mg/m² a 800 mg/m², de 50 mg/m² a 500 mg/m² y en dosificaciones de 100 mg/m², 150 mg/m², 200 mg/m², 250 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m² o 450 mg/m². También se apreciará que las técnicas reconocidas y las empíricas se pueden usar para determinar la dosificación apropiada.

En cualquier caso, los ADCs de DLL3 se administran preferiblemente según sea necesario, a los sujetos que lo necesiten. Los expertos en la materia pueden determinar la frecuencia de la administración, como por ejemplo un médico de cabecera, basándose en las consideraciones de la afección que se está tratando, la edad del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección que se está tratando, el estado general de salud del sujeto que se está tratando y similares. Generalmente, una dosis efectiva del conjugado de DLL3 se administra a un sujeto una o varias veces. Más particularmente, una dosis efectiva de ADC se administra al sujeto una vez al mes, más de una vez al mes o menos de una vez al mes. En ciertas realizaciones, la dosis efectiva del ADC de DLL3 se puede administrar varias veces, incluso durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses, al menos un año, al menos dos años o un período de varios años. En todavía otros casos, pueden transcurrir varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o incluso un año o varios años entre la administración de los moduladores descritos.

En ciertas realizaciones preferidas, el curso del tratamiento que implica moduladores de conjugados comprenderá dosis múltiples del producto farmacológico seleccionado durante un período de semanas o meses. Más específicamente, los moduladores de conjugados de la presente invención se pueden administrar una vez al día, cada dos días, cada cuatro días, cada semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada mes, cada seis semanas, cada dos meses, cada diez semanas o cada tres meses. A este respecto, se apreciará que las dosificaciones se pueden modificar o que el intervalo puede ajustarse en función de la respuesta del paciente y las prácticas clínicas.

Las dosificaciones y los regímenes también se pueden determinar empíricamente para las composiciones terapéuticas descritas en individuos a los que se les ha administrado una o varias administraciones. Por ejemplo, a los individuos se les pueden administrar dosificaciones incrementadas de una composición terapéutica producida como se describe en el presente documento. En realizaciones seleccionadas, la dosificación puede aumentarse, reducirse o atenuarse gradualmente en función de efectos secundarios o toxicidad determinados empíricamente u observados. Para evaluar la eficacia de la composición seleccionada, se puede seguir un marcador de la enfermedad, el trastorno o la afección específica como se ha descrito anteriormente. Para el cáncer, esto incluye mediciones directas del tamaño del tumor mediante palpación u observación visual, una medición indirecta del tamaño del tumor mediante rayos X u otras técnicas de formación de imagen; una mejora según lo evaluado por una biopsia tumoral directa y un examen microscópico de la muestra de tumor; la medición de un marcador tumoral indirecto (por ejemplo, PSA para el cáncer de próstata) o un antígeno tumorigeno identificado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, una disminución del dolor o la parálisis; una mejora del habla, la visión, la respiración u otra discapacidad asociada con el tumor; un apetito incrementado; o un aumento de la calidad de vida medido según pruebas aceptadas o una prolongación de la supervivencia. Para un experto en la materia será evidente que la dosificación variará dependiendo del individuo, del tipo de afección neoplásica, del estadio de la afección neoplásica, de si la afección neoplásica ha comenzado a metastatizarse en otra ubicación en el individuo y de tratamientos pasados y concurrentes que se hayan empleado.

3. Terapias de combinación

De acuerdo con la presente invención, las terapias de combinación pueden ser particularmente útiles para disminuir o inhibir la proliferación de células neoplásicas no deseadas, disminuir la aparición de un cáncer, disminuir o prevenir la recidiva de un cáncer, o disminuir o prevenir la propagación o metástasis de un cáncer. En tales casos, los ADCs de la presente invención pueden actuar como agentes sensibilizadores o quimiosensibilizadores al eliminar las CSCs que de otro modo apuntalarían y perpetuarían la masa tumoral, y permiten de este modo un uso más efectivo de los actuales agentes convencionales citorreductores o los agentes anticancerígenos. Es decir, los ADCs descritos pueden, en ciertos casos, proporcionar un efecto mejorado (por ejemplo, de naturaleza aditiva o sinérgica) que potencia el modo de acción de otro agente terapéutico administrado. En el contexto de la presente descripción, "terapia de combinación" debe interpretarse de manera amplia y se refiere simplemente a la administración de un ADC de DLL3 y uno o varios agentes anticancerígenos que incluyen, pero que no están limitados a, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes antiangiogénicos, agentes citorreductores, agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia y radioterapéuticos, agentes anticancerígenos dirigidos (incluidos los anticuerpos monoclonales y las entidades de molécula pequeña), BRMs, anticuerpos terapéuticos, vacunas contra el cáncer, citocinas, terapias hormonales, radioterapia y agentes antimetastásicos y agentes inmunoterapéuticos, que incluyen enfoques tanto específicos como no específicos.

No hay ningún requisito para que los resultados combinados sean aditivos de los efectos observados cuando cada tratamiento (por ejemplo, un ADC y un agente contra el cáncer) se realiza por separado. Aunque al menos generalmente son deseables los efectos aditivos, cualquier efecto antitumoral aumentado por encima de una de las terapias aisladas, es beneficioso. Además, la invención no requiere que el tratamiento combinado muestre efectos sinérgicos. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que con ciertas combinaciones seleccionadas que comprenden realizaciones preferidas, se puede observar un sinergismo.

Al poner en práctica la terapia de combinación, el conjugado de DLL3 y el agente anticancerígeno se pueden administrar al sujeto simultáneamente, ya sea en una sola composición, o en dos o más composiciones distintas que utilizan las mismas vías o diferentes vías de administración. Alternativamente, el ADC puede preceder, o seguir, al tratamiento con un agente anticancerígeno, por ejemplo, en intervalos que varían de minutos a semanas. El período de tiempo entre cada administración es tal, que el agente anticancerígeno y el conjugado pueden ejercer un efecto combinado sobre el tumor. En al menos una realización, tanto el agente anticancerígeno como el ADC se administran con desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente dos semanas de separación entre sí. En otras realizaciones más, varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7), varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) o varios meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) pueden transcurrir entre la administración del ADC de DLL3 y el agente anticancerígeno.

La terapia de combinación se puede administrar una vez, dos veces o al menos durante un período de tiempo hasta que la afección se trate, se mitigue o se cure. En algunas realizaciones, la terapia de combinación se administra varias veces, por ejemplo, de tres veces al día a una vez cada seis meses. La administración se puede realizar con un pauta tal de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses o se puede administrar de forma continua a través de una minibomba. La terapia de combinación se puede administrar por cualquier vía, como se ha señalado anteriormente. La terapia de combinación se puede administrar en un sitio distante del sitio del tumor.

En una realización, un ADC se administra en combinación con uno o varios agentes anticancerígenos para un ciclo de tratamiento corto a un sujeto que lo necesite. La invención también contempla la administración discontinua o las dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. El conjugado y el agente anticancerígeno se pueden administrar indistintamente, en días o semanas alternos; o se puede administrar una secuencia de tratamientos con anticuerpos, seguida de uno o varios tratamientos de terapia con agentes anticancerígenos. En cualquier caso, co-

mo entenderán los expertos en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos y los conjugados descritos estarán generalmente en torno a las ya empleadas en terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

5 En otra realización preferida, los conjugados de DLL3 de la presente invención se pueden usar en una terapia de mantenimiento para reducir o eliminar la posibilidad de recidiva de un tumor después de la presentación inicial de la enfermedad. Preferiblemente, el trastorno se habrá tratado y la masa tumoral inicial se habrá eliminado, reducido o mejorado de manera que el paciente sea asintomático o esté en remisión. En ese momento, al sujeto se le pueden administrar cantidades farmacéuticamente eficaces de los conjugados de DLL3 descritos, una o varias veces, aunque haya poca o ninguna indicación de enfermedad, utilizando procedimientos de diagnóstico convencionales. En algunas realizaciones, los ADCs se administrarán con una pauta regular durante un período de tiempo, tal como 10 semanalmente, cada dos semanas, mensualmente, cada seis semanas, cada dos meses, cada tres meses cada seis meses o anualmente. Dadas las enseñanzas del presente documento, un experto en la técnica podría determinar fácilmente las dosificaciones favorables y los regímenes de dosificación para reducir el potencial de recidiva de una enfermedad. Además, esos tratamientos podrían continuarse durante un período de semanas, meses, años o incluso indefinidamente, según la respuesta del paciente y los parámetros clínicos y de diagnóstico. 15

En todavía otra realización preferida, los ADCs de la presente invención se pueden usar profilácticamente o como terapia adyuvante para prevenir o reducir la posibilidad de metástasis tumoral después de un procedimiento de citorreducción. Tal como se utiliza en la presente descripción, un "procedimiento de citorreducción" se define ampliamente y significa cualquier procedimiento, técnica o método que elimine, reduzca, trate o mejore un tumor o la proliferación de un tumor. Los procedimientos de citorreducción ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cirugía, tratamientos con radiación (es decir, radiación con haces), quimioterapia, inmunoterapia o ablación. En los momentos apropiados, fácilmente determinados por un experto en la materia, de cara a la presente descripción, los ADCs descritos se pueden administrar según lo sugerido por procedimientos clínicos, diagnósticos o terapéuticos para reducir la metástasis tumoral. Los conjugados se pueden administrar una o varias veces en dosificaciones farmacéuticamente 20 efectivas según se determine, usando técnicas convencionales. Preferiblemente, el régimen de dosificación estará acompañado por técnicas apropiadas de diagnóstico o seguimiento que permitan su modificación. 25

Todavía otros casos de la descripción comprenden la administración de los conjugados de DLL3 descritos a sujetos que son asintomáticos pero que corren el riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo. Es decir, los conjugados de la presente invención se pueden usar en un sentido verdaderamente preventivo y se pueden administrar a pacientes que han sido examinados o sometidos a pruebas y tienen uno o varios factores de riesgo destacados (por ejemplo, indicaciones genómicas, antecedentes familiares, resultados de pruebas *in vivo* o *in vitro*, etc.) pero no han desarrollado una neoplasia. En tales casos, los expertos en la técnica podrán determinar un régimen de dosificación eficaz mediante una observación empírica o mediante prácticas clínicas aceptadas. 30

4. Agentes anticancerígenos

35 Como se ha descrito a lo largo de la presente solicitud, los conjugados de DLL3 de la presente invención se pueden usar en combinación con agentes anticancerígenos. La expresión "agente anticancerígeno" o "agente antiproliferativo" significa cualquier agente que se puede usar para tratar un trastorno de proliferación celular como el cáncer, e incluye, pero que no está limitada a, agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes antiangiogénicos, agentes citorreductores, agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia y radioterapéuticos, agentes anticancerígenos dirigidos, BRMs, anticuerpos terapéuticos, vacunas contra el cáncer, citocinas, terapias hormonales, radioterapia y 40 agentes antimetastásicos y agentes inmunoterapéuticos.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "agente citotóxico" significa una sustancia que es tóxica para las células y disminuye o inhibe la función de las células y/o causa la destrucción de las células. En ciertas realizaciones, la sustancia es una molécula natural obtenida a partir de un organismo vivo. Ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias (por ejemplo, toxina diftérica, endotoxina y exotoxina de *Pseudomonas*, enterotoxina A estafilocócica), hongos (por ejemplo, α -sarcina, restrictocina), plantas (p. ej., abrina, ricina, modicina, viscumina, proteína anti-viral de la hierba carmín, saporina, gelonina, momoridina, tricosantina, toxina de la cebada, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de *diantina*, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitegelina, restrictocina, fenomicina, neomicina y tricotece- 50 nos) o animales, (por ejemplo, ARNasas citotóxicas, tales como ARNasas pancreáticas extracelulares; ADNasa I, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas).

Para los fines de la presente invención, un "agente quimioterapéutico" comprende un compuesto químico que disminuye o inhibe no específicamente el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de las células cancerosas (por ejemplo, agentes citotóxicos o citostáticos). Tales agentes químicos se dirigen frecuentemente contra procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o la división celular y, por lo tanto, son particularmente eficaces contra las células cancerosas, que generalmente crecen y se dividen rápidamente. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza los microtúbulos y, por lo tanto, inhibe las células que entran en la mitosis. En general, los agentes quimioterapéuticos pueden incluir cualquier agente químico que inhiba, o esté diseñado para inhibir, una célula cancerosa o una 60 célula que probablemente se vuelva cancerosa o genere una progenie tumorigena (por ejemplo, TIC). Tales agentes

se administran frecuentemente, y con frecuencia son más efectivos, en combinación, por ejemplo, en regímenes como CHOP o FOLFIRI.

Ejemplos de agentes anticancerígenos que se pueden usar en combinación con los ADCs de DLL3 de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, alquilsulfonatos, aziridinas, etileniminas y metilaminas, acetogeninas, una camptotecina, briostatina, calistatina, CC-1065, criptoficinas, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, una sarcodictina, espongiatina, mostazas de nitrógeno, antibióticos, antitubercúlicos de enedina, dinemicina, bisfosfonatos, esperamicina, cromóforos de antibiótico de enedina cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina, epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, plemomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, erlotinib, vemurafenib, crizotinib, sorafenib, ibrutinib, enzalutamida, análogos de ácido fólico, análogos de purina, andrógenos, anti-suprarrenales, reponedor de ácido fólico tal como ácido frofínico, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracil, amsacrina, bestrabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, una eptilona, etoglúcido, nitrato de galio, hidroxurea, lentinán, lonidainina, maytansinoides, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR), razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manobustina; mitocronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, cloranbucil; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11), inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina; retinoides; capecitabina; combretastatina; leucovorina; oxaliplatino; inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos, inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales y anti-andrógenos; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; vinorelbina y esperamicinas y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes anticancerígenos particularmente preferidos comprenden compuestos disponibles comercial o clínicamente, tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, n° de CAS 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (n° de CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cisdiamina, dicloroplatino(II), n° de CAS 15663-27-1), carboplatino (n° de CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, n° de CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®). Agentes anticancerígenos adicionales disponibles comercial o clínicamente incluyen oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (exento de Cremophor), formulaciones en nanopartículas de paclitaxel modificadas genéticamente con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), vandetanib (RINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); vinorelbina (NAVELBINE®); capecitabina (XELODA®, Roche), tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno, FARESTON® (citrato de toremifina) MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestania, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca).

En otras realizaciones, los conjugados de DLL3 de la presente invención se pueden usar en combinación con uno cualquiera de una serie de anticuerpos (o agentes inmunoterapéuticos) actualmente en ensayos clínicos o comercialmente disponibles. Con este fin, los conjugados de DLL3 descritos se pueden usar en combinación con un anticuerpo seleccionado a partir del grupo que consiste en abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, baviximab, bectumomab, bevacizumab, bivatumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatu-

mumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecomeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatumumab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, narnatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nofetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatuzumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, pintumomab, primumab, racotumomab, ramucirumab, radretumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatuzumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49, 3F8 y combinaciones de los mismos.

Todavía otros casos particularmente preferidos comprenderán el uso de anticuerpos en pruebas o aprobados para terapia contra el cáncer que incluyen, pero no se limitan a, rituximab, trastuzumab, gemtuzumab ozogamicina, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetán, tositumomab, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, ramucirumab, ofatumumab, ipilimumab y brentuximab vedotina. Los expertos en la materia podrán identificar fácilmente agentes anticancerígenos adicionales que sean compatibles con las enseñanzas de este documento.

5. Radioterapia

La presente descripción también proporciona la combinación de conjugados de DLL3 con radioterapia (es decir, cualquier mecanismo para inducir daños en el ADN, localmente dentro de las células tumorales, como la radiación gamma, rayos X, radiación UV, microondas, emisiones electrónicas y similares). También se contempla la terapia de combinación que utiliza el suministro dirigido de radioisótopos a las células tumorales, y los conjugados descritos se pueden usar en relación con un agente contra el cáncer dirigido u otros medios de direccionamiento. Normalmente, la radioterapia se administra en impulsos durante un período de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 semanas. La radioterapia se puede administrar a sujetos con cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente 6 a 7 semanas. Opcionalmente, la radioterapia se puede administrar como una dosis única o como múltiples dosis secuenciales.

VII. Indicaciones

Se apreciará que los ADCs de la presente invención se pueden usar para tratar, prevenir, controlar o inhibir la aparición o la recidiva de cualquier trastorno asociado con DLL3. Por consiguiente, ya sea administrados solos o en combinación con un agente anticancerígeno o con radioterapia, los ADCs de la invención son particularmente útiles para tratar afecciones neoplásicas en pacientes o sujetos que pueden incluir tumores benignos o malignos (por ejemplo, carcinomas suprarrenales, de hígado, renales, vesicales, mamarios, gástricos, ováricos, colorrectales, prostáticos, pancreáticos, pulmonares, de tiroides, hepáticos, cervicales, endometriales, esofágicos y uterinos; sarcomas; glioblastomas; y diversos tumores de cabeza y cuello); leucemias y neoplasias linfoides; otros trastornos tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromales y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos, inmunológicos y trastornos causados por agentes patógenos. En particular, las dianas clave para el tratamiento son afecciones neoplásicas que comprenden tumores sólidos, aunque las neoplasias malignas hematológicas están dentro del alcance de la invención.

El término "tratamiento", tal y como se usa en el presente documento en el contexto del tratamiento de una afección, se refiere en general al tratamiento y la terapia, ya sea de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en donde se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, un alto en la tasa de progreso, una regresión de la afección, una mejoría de la afección y una curación de la afección. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a esa cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcional con una relación razonable de beneficio/riesgo, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

De manera similar, la expresión "cantidad profilácticamente eficaz", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, una composición o una dosificación que comprende un compuesto activo, que es efectiva para producir algún efecto profiláctico deseado, proporcional con una relación razonable de beneficio/riesgo, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

Más específicamente, las afecciones neoplásicas sujetas a tratamiento de acuerdo con la presente invención, se pueden seleccionar a partir del grupo que incluye, pero que no se limita a, tumores de las glándulas suprarrenales, cánceres asociados con SIDA, sarcoma de partes blandas alveolares, tumores astrocíticos, cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición), cáncer de huesos (adamantinoma, quistes óseos aneurismáticos, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres de la médula espinal y del cerebro, tumores cerebrales metastásicos, cáncer de mama, tumores del cuerpo carotideo, cáncer cervical, condrosarcoma, cordoma, carcinoma

de células renales cromóforas, carcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, histiocitomas fibrosos benignos cutáneos, tumores desmoplásicos de células redondas pequeñas, ependimomas, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis ósea imperfecta, displasia fibrosa del hueso, cánceres de la vesícula biliar y del conducto biliar, enfermedad gestacional trofoblástica, tumores de células germinales, cánceres de cabeza y cuello, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer renal (nefroblastoma, carcinoma papilar de células renales), leucemias, lipoma/tumores lipomatosos benignos, liposarcoma/tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cánceres de pulmón (carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, etc.), meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cánceres de páncreas, carcinomas papilares de tiroides, tumores de paratiroides, cánceres pediátricos, tumores de la vaina del nervio periférico, feocromocitoma, tumores de pituitaria, cáncer de próstata, melanoma unveal grave, trastornos hematológicos raros, cáncer metastásico renal, tumor rabdoide, rhabdomyosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejido blando, cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, carcinoma tímico, timoma, cáncer metastásico de tiroides y cánceres uterinos (carcinoma de cuello uterino, carcinoma endometrial y leiomioma).

En ciertas realizaciones preferidas, el trastorno proliferativo comprenderá un tumor sólido que incluye, pero no se limita a, tumor suprarrenal, de hígado, riñón, vejiga, mama, gástrico, ovario, cervical, uterino, esofágico, colorrectal, próstata, páncreas, pulmón (tanto de células pequeñas como no pequeñas), tiroides, carcinomas, sarcomas, glioblastomas y diversos tumores de cabeza y cuello. En otros casos preferidos y como se muestra en los Ejemplos a continuación, los ADCs descritos son especialmente efectivos para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (por ejemplo, el cáncer de pulmón de células no pequeñas de células escamosas o el cáncer de pulmón de células pequeñas de células escamosas). En una realización, el cáncer de pulmón es refractario, recidivante o resistente a un agente basado en platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, topotecán) y/o un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, larotaxel o cabazitaxel).

En casos particularmente preferidos, los ADCs descritos se pueden usar para tratar el cáncer de pulmón de células pequeñas. Con respecto a tales casos, los moduladores conjugados se pueden administrar a pacientes que presentan una enfermedad en estadio localizado. En otros casos, los ADCs descritos se administrarán a pacientes que presenten enfermedad en estadio extendido. En otros casos preferidos, los ADCs descritos se administrarán a pacientes refractarios (es decir, aquellos que son recurrentes durante o poco después de completar un ciclo de terapia inicial) o pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas recurrentes. Aún otros casos comprenden la administración de los ADCs descritos a pacientes sensibles (es decir, aquellos cuya recaída tarda más que 2-3 meses después de la terapia primaria). En cada caso, se apreciará que se pueden usar ADCs compatibles en combinación con otros tratamientos anticancerígenos dependiendo del régimen de dosificación seleccionado y del diagnóstico clínico.

Como se ha descrito anteriormente, los ADCs descritos se pueden usar adicionalmente para prevenir, tratar o diagnosticar tumores con características neuroendocrinas o fenotipos que incluyen tumores neuroendocrinos. Los tumores neuroendocrinos (NETs) verdaderos o canónicos que surgen del sistema endocrino disperso son relativamente raros, con una incidencia de 2 - 5 por cada 100.000 personas, pero altamente agresivos. Los tumores neuroendocrinos se presentan en el riñón, tracto genitourinario (vejiga, próstata, ovario, cuello uterino y endometrio), tracto gastrointestinal (colon, estómago), tiroides (cáncer medular de tiroides) y pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino de células grandes). Estos tumores pueden secretar diversas hormonas, incluyendo la serotonina y/o la cromogranina A, que pueden causar síntomas debilitantes conocidos como síndrome carcinoide. Tales tumores se pueden señalar mediante marcadores inmunohistoquímicos positivos, como la enolasa específica de neuronas (NSE, también conocida como gamma enolasa, símbolo genético = ENO2), CD56 (o NCAM1), cromogranina A (CHGA) y sinaptofisina (SYP) o por genes conocidos por mostrar una expresión elevada como ASCL1. Desafortunadamente, las quimioterapias tradicionales no han sido particularmente efectivas en el tratamiento de los NETs y una metástasis hepática es un resultado común.

Si bien los ADCs descritos se pueden usar ventajosamente para tratar tumores neuroendocrinos, también se pueden usar para tratar, prevenir o diagnosticar tumores seudoneuroendocrinos (pNETs) que imitan genotípicamente o fenotípicamente, se parecen o muestran rasgos comunes con tumores neuroendocrinos canónicos. Los tumores seudoneuroendocrinos o tumores con características neuroendocrinas son tumores que se originan en células del sistema neuroendocrino difuso o en células en las que una cascada de diferenciación neuroendocrina se ha reactivado de forma aberrante durante el proceso oncogénico. Tales pNETs comparten comúnmente ciertas características fenotípicas o bioquímicas con los tumores neuroendocrinos definidos tradicionalmente, incluyendo la capacidad de producir subconjuntos de aminas biológicamente activas, neurotransmisores y hormonas peptídicas. Histológicamente, tales tumores (NETs y pNETs) comparten una apariencia común que a menudo muestra células pequeñas densamente conectadas con un citoplasma mínimo de citopatología blanda y núcleos punteados redondos u ovalados. Para los fines de la presente invención, los marcadores histológicos o marcadores genéticos comúnmente expresados que se pueden usar para definir tumores neuroendocrinos y seudoneuroendocrinos incluyen, pero que no están limitados a, cromogranina A, CD56, sinaptofisina, PGP9.5, ASCL1 y enolasa específica de neuronas. (NSE).

Por consiguiente, los ADCs de la presente invención se pueden usar de forma beneficiosa para tratar tanto tumores seudoneuroendocrinos como tumores neuroendocrinos canónicos. A este respecto, los ADCs se pueden usar como

se describe en el presente documento para tratar tumores neuroendocrinos (tanto NET como pNET) que se originan en el riñón, tracto genitourinario (vejiga, próstata, ovario, cuello uterino y endometrio), tracto gastrointestinal (colon, estómago), tiroides (cáncer de tiroides medular) y pulmón (carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino de células grandes). Además, los ADCs de la presente invención se pueden usar para tratar tumores que expresan uno o varios marcadores seleccionados a partir del grupo que consiste en NSE, CD56, sinaptofisina, cromogranina A, ASCL1 y PGP9.5 (UCHL1). Es decir, la presente invención se puede usar para tratar a un sujeto que padece un tumor que es NSE⁺ o CD56⁺ o PGP9.5⁺ o ASCL1⁺ o SYP⁺ o CHGA⁺ o alguna combinación de los mismos.

Con respecto a las neoplasias malignas hematológicas, se apreciará además que los compuestos y métodos de la presente descripción pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento de una variedad de linfomas de linfocitos B, incluyendo el linfoma de células foliculares de bajo grado/NHL (FCC), linfoma de células del manto (MCL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado elevado, NHL linfoblástico de grado elevado, NHL de células pequeñas no escindidas de grado elevado, NHL de enfermedad voluminosa, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma linfoplasmacitoide (LPL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células grandes (DLCL), linfoma de Burkitt (BL), linfomas relacionados con el SIDA, linfoma monocítico de linfocitos B, linfoma o adenopatía angioinmunoblástica, linfoblastoma pequeño linfocítico, folicular, difuso de células grandes, difuso de células pequeñas escindidas, inmunoblástico de células grandes, linfoma pequeño, no escindido, de Burkitt y no de Burkitt, folicular, predominantemente de células grandes; folicular, predominantemente de células pequeñas escindidas; y folicular, linfomas mixtos de células pequeñas escindidas y grandes. Véase, Gaidono et al., "Lymphomas", IN CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, Vol. 2: 2131-2145 (DeVita et al., compiladores, 5ª ed. 1997). Debería estar claro para los expertos en la técnica que estos linfomas a menudo tendrán diferentes nombres debido a los cambios en los sistemas de clasificación, y que los pacientes que tienen linfomas clasificados con diferentes nombres también se pueden beneficiar de los regímenes terapéuticos combinados de la presente invención.

La presente descripción también proporciona un tratamiento preventivo o profiláctico de sujetos que presentan tumores benignos o precancerosos. Más allá de ser un trastorno asociado con DLL3, no se cree que ningún tipo particular de tumor o trastorno proliferativo se deba excluir de un tratamiento utilizando la presente invención. Sin embargo, el tipo de células tumorales puede ser relevante para el uso de la descripción en combinación con agentes terapéuticos secundarios, particularmente agentes quimioterapéuticos y agentes anticancerígenos dirigidos.

Preferiblemente, el "sujeto" o el "paciente" que se va a tratar será humano aunque, tal y como se usa en el presente documento, los términos se entienden expresamente que comprenden cualquier especie que incluyendo todos los mamíferos. Por consiguiente, el sujeto/paciente puede ser un animal, un mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (p. ej., canguro, wombat), un monotrema (p. ej., ornitorrinco), un roedor (p. ej., una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un mívrido (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), un ave (por ejemplo, un pájaro), un cánido (por ejemplo, un perro), un félido (por ejemplo, un gato), un équido (por ejemplo, un caballo), un pórcido (por ejemplo, un cerdo), un óvido (por ejemplo, una oveja), un bóvido (por ejemplo, una vaca), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o un homínido), un mono (por ejemplo, un tití, un babuino), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

VIII. Artículos manufacturados

También se proporcionan recipientes y kits farmacéuticos que comprenden uno o varios envases, que comprenden una o varias dosis de ADCs de DLL3. En ciertas realizaciones, se proporciona una dosificación unitaria en donde la dosificación unitaria contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende, por ejemplo, un conjugado anti-DLL3, con o sin uno o varios agentes adicionales. Para otras realizaciones, una dosificación unitaria de ese tipo se suministra en una jeringa precargada de un solo uso para inyección. En todavía otras realizaciones, la composición contenida en la dosificación unitaria puede comprender solución salina, sacarosa o similares; un tampón, tal como fosfato o similares; y/o formularse dentro de un intervalo de pH estable y efectivo. Alternativamente, en ciertas realizaciones, la composición de conjugado se puede proporcionar como un polvo liofilizado que se puede reconstituir mediante la adición de un líquido apropiado, por ejemplo, agua estéril o solución salina. En ciertas realizaciones preferidas, la composición comprende una o varias sustancias que inhiben la agregación de proteínas, incluidas, pero sin limitarse a, sacarosa y arginina. Cualquier etiqueta en el (los) envase(s) o asociado con los mismos, indica que la composición de conjugado adjunta se utiliza para tratar la afección por enfermedad neoplásica elegida.

La presente invención también proporciona kits para producir unidades de administración de dosis única o dosis múltiples de conjugados de DLL3 y, opcionalmente, uno o varios agentes anticancerígenos. El kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado con el mismo. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico y contener una cantidad farmacéuticamente eficaz de los conjugados de DLL3 descritos en una forma conjugada o no conjugada. En otras realizaciones preferidas, el o los envases comprenden un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Esos kits generalmente contendrán en un envase adecuado, una formulación farmacéuticamente aceptable del conjugado de DLL3 y, opcionalmente, uno o varios agentes anti-

5 cancerígenos en el mismo envase o envases diferentes. Los kits también pueden contener otras formulaciones farmacéuticamente aceptables, ya sea para diagnóstico o terapia combinada. Por ejemplo, además de los conjugados de DLL3 de la invención, tales kits pueden contener uno o varios de una gama de agentes anticancerígenos tales como fármacos quimioterapéuticos o radioterapéuticos; agentes antiangiogénicos; agentes antimetastásicos; agentes anticancerígenos dirigidos; agentes citotóxicos; y/u otros agentes anticancerígenos.

10 Más específicamente, los kits pueden tener un solo envase que contiene los ADCs de DLL3, con o sin componentes adicionales, o pueden tener distintos envases para cada agente deseado. Cuando se proporcionan agentes terapéuticos combinados para conjugar, se puede mezclar previamente una solución aislada, ya sea en una combinación molar equivalente, o con un componente en exceso del otro. Alternativamente, los conjugados de DLL3 y cualquier agente anticancerígeno opcional del kit se pueden mantener separados dentro de distintos envases antes de la administración a un paciente. Los kits también pueden comprender un segundo/tercer medio de envase para contener un tampón estéril, farmacéuticamente aceptable u otro diluyente, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de Ringer y solución de dextrosa.

15 Cuando los componentes del kit se proporcionan en una o varias soluciones líquidas, la solución líquida es preferiblemente una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa o salina estéril. Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando se suministran reactivos o componentes en forma de polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se puede proporcionar en otro envase.

20 Como se ha indicado brevemente más arriba, los kits también pueden contener un medio mediante el cual se administra el conjugado de anticuerpo y cualquier componente opcional, a un animal o un paciente, por ejemplo, una o varias agujas, bolsas i.v. o jeringas, o incluso un cuentagotas, una pipeta u otro aparato similar, desde el cual la formulación se puede inyectar o introducir en el animal o aplicar sobre un área enferma del cuerpo. Los kits de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener los viales, o similares, y otro componente confinados en espacios reducidos para la venta comercial, tal como, por ejemplo, envases de plástico inyectados o moldeados en los cuales los viales deseados y otros aparatos están colocados y retenidos. Cualquier etiqueta o prospecto indica que la composición conjugada de DLL3 se usa para tratar el cáncer, por ejemplo, el cáncer de pulmón de células pequeñas.

25 En otras realizaciones preferidas, los conjugados de la presente invención se pueden usar junto con, o comprender, dispositivos para diagnóstico o terapéuticos útiles en la prevención o el tratamiento de trastornos proliferativos. Por ejemplo, en un caso preferido, los compuestos y composiciones de la presente descripción se pueden combinar con ciertos dispositivos o instrumentos de diagnóstico que se pueden usar para detectar, realizar un seguimiento, cuantificar o perfilar células o compuestos marcadores involucrados en la etiología o la manifestación de trastornos proliferativos. Para casos seleccionados, los compuestos marcadores pueden comprender NSE, CD56, sinaptofisina, cromogranina A y PGP9.5.

30 En casos particularmente preferidos, los dispositivos se pueden usar para detectar, realizar un seguimiento y/o cuantificar células tumorales circulantes ya sea *in vivo* o *in vitro* (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/0128801). En todavía otras realizaciones preferidas, y como se ha descrito anteriormente, las células tumorales circulantes pueden comprender células madre de cáncer.

IX. Resumen del Listado de Secuencias

40 Se adjunta a la presente solicitud una lista de secuencias que comprende diversas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos. La siguiente TABLA 2 proporciona un resumen de las secuencias incluidas.

TABLA 2

SEQ ID NO.	Descripción
1	Proteína de la isoforma 1 de DLL3
2	Proteína de la isoforma 2 de DLL3
3	Proteína del epítipo SC16.23
4	Proteína del epítipo SC16.34 y SC 16.56
5	Proteína de la región kappa constante
6	Proteína de la región constante de IgG1
7-19	Guardada
20	ADN de VL SC16.3 (alineado con la proteína codificada)
21	Proteína de VL SC16.3

SEQ ID NO.	Descripción
22	ADN de VH SC16.3 (alineado con la proteína codificada)
23	Proteína de VH SC16.3
24-387	Clones murinos adicionales como en SEQ ID NOs: 20-23
388-407	Clones humanizados como en SEQ ID NOs: 20-23
408,409,410	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC16.13
411,412,413	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC16.13
414,415,416	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC16.15
417,418,419	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC16.15
420,421,422	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC16.25
423,424,425	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC16.25
426, 427, 428	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC16.34
429, 430, 431	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC16.34
432, 433, 434	CDRL1, CDRL2, CDRL3 de hSC16.56
435, 436, 437	CDRH1, CDRH2, CDRH3 de hSC16.56

X. Varios

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluyen los plurales y los términos en plural incluyen el singular. Más específicamente, tal y como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una pluralidad de proteínas; la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, y similares. Además, los intervalos proporcionados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas incluyen tanto los puntos extremos como todos los puntos entre los puntos extremos. Por lo tanto, un intervalo de 2,0 a 3,0 incluye 2,0, 3,0 y todos los puntos entre 2,0 y 3,0.

En general, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácidos nucleicos y proteínas e hibridación, descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente descripción se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se describen a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6ª ed., W.B. Saunders Company (2010); Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); y Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. La nomenclatura utilizada en relación con los procedimientos y las técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en este documento son aquellas bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Además, cualquier título de sección usado en este documento es solo para fines organizativos y no debe interpretarse como limitante del tema descrito.

Ciertas abreviaturas usadas en este documento:

30	Ac	acetilo
	Acm	acetamidometilo
	Alloc	aliloxicarbonilo
	Boc	dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
	t-Bu	<i>terc</i> -butilo
35	Bzl	bencilo, en donde Bzl-OMe es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno
	Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, en donde Z-Cl y Z-Br son clorobenciloxi y bromobenciloxi carbonilo respectivamente
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida

	Dnp	dinitrofenilo
	DTT	ditiotreitól
	Fmoc	9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
	imp	grupo protector N-10 imina: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-
5	PAB MC-OSu	aleimidocaprolil-O-N-succinimida
	Moc	metoxicarbonilo
	MP	maleimidopropanamida
	Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
	PAB	para-aminobenciloxicarbonilo
10	PEG	etilenoxi
	PNZ	carbamato de p-nitrobencilo
	Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
	TBDMS	terc-butildimetilsililo
	TBDPS	terc-butildifenilsililo
15	Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
	Tos	tosilo
	Troc	cloruro de 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
	Trt	tritol
	Xan	xantilo

20 Ejemplos

La presente invención, descrita de este modo en general más arriba, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos relacionados con PBD 1-4 son ejemplos ilustrativos.

A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a la misma.

25 Ejemplo 1

Preparación de compuestos de fármaco PBD-enlazador

Los compuestos de fármaco PBD-enlazador, DL1 - DL5 se sintetizaron de la siguiente manera:

A. Métodos experimentales generales

30 Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se proporcionan en g/100 mL. Los puntos de fusión se midieron utilizando un aparato digital de punto de fusión (Electrothermal). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro IR Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se indican en relación con TMS ($\delta = 0,0$ ppm), y las señales se designan como s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (doble triplete), dd (doblete de dobletes), ddd (doble doblote de dobletes) o m (multiplete), con constantes de acoplamiento proporcionadas en hercios (Hz). Los datos de espectroscopía de masas (MS) se recogieron utilizando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a una HPLC de Waters 2695 con Waters 2996 PDA. Los parámetros de Waters Micromass ZQ utilizados fueron: Capilaridad (kV), 3,38; Cono (V), 35; Extractor (V), 3,0; Temperatura de la fuente (°C), 100; Temperatura de desolvatación (°C), 200; Caudal de cono (L/h), 50; Caudal de desolvatación (L/h), 250. Los datos de la espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS) se recogieron en un aparato Waters Micromass QTOF Global en modo W positivo, utilizando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó sobre placas de aluminio y gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y en la cromatografía ultrarrápida se utilizó gel de sílice (Merck 60, malla 230-400 ASTM). Excepto los reactivos HOBt (NovaBiochem) y de soporte sólido (Argonaut), todos los demás productos químicos y disolventes se compraron en Sigma-Aldrich y se usaron tal y como se suministraron sin una purificación adicional. Los disolventes anhidros se prepararon mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seco en presencia de un agente de secado apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4Å o alambre de sodio. El éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60°C.

En la generación de los compuestos descritos, la LC/MS se realizó utilizando dos procedimientos ligeramente diferentes. El procedimiento por defecto era el primer método descrito que se usó a menos que se indique lo contrario.

50 *Método 1 (método por defecto, utilizado a menos que se indique lo contrario)* - La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó utilizando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1%) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1%). Gradiente: la composición inicial de 5% de B se mantuvo durante 1,0 min, luego aumentó desde el 5% de B hasta el 95% de B durante un período de 3 min. La composición se mantuvo durante 0,1 min al 95% de B, luego se devolvió al 5% de B en 0,3 minutos y se mantuvo ahí durante 0,87 min. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 5 minutos.

Método 2 - La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó utilizando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1%) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1%). Gradiente: la composición inicial de 5% de B se mantuvo durante 1,0 minu-

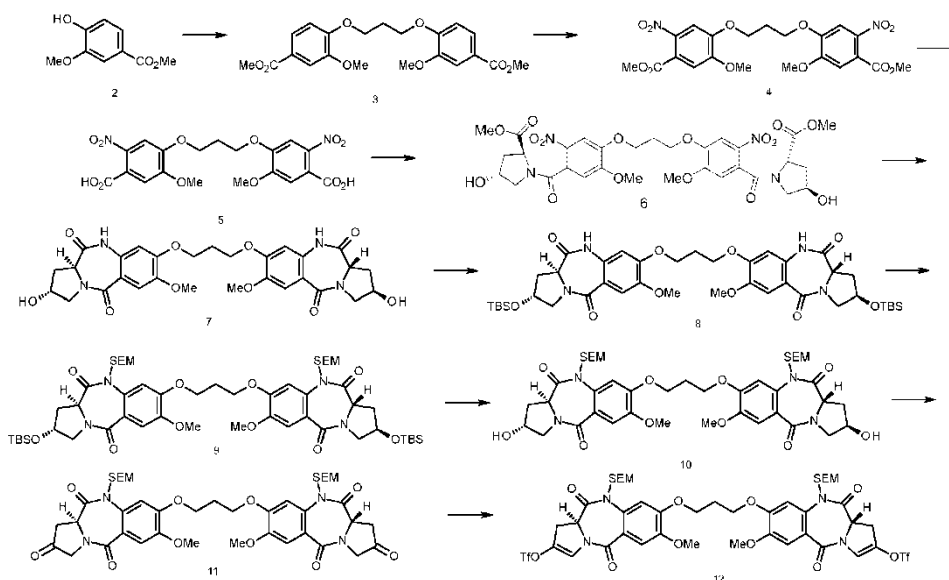
to, luego aumentó desde el 5% de B al 95% de B durante un período de 2,5 minutos. La composición se mantuvo durante 0,5 minutos a 95% de B, luego se devolvió a 5% de B en 0,1 minutos y se mantuvo ahí durante 0,9 minutos. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 5 minutos.

5 Para ambos métodos, el caudal era de 3,0 mL/min, 400 μ L se dividió a través una pieza en T de volumen muerto cero que atraviesa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 exploraciones). Columna: Phenomenex Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

10 Las condiciones de la purificación ultrarrápida en fase inversa eran las siguientes: El sistema de purificación ultrarrápida (Varian 971-Fp) se ejecutó utilizando una fase móvil de agua (A) y acetonitrilo (B). Gradiente: composición inicial 5% de B sobre 20 C.V. (Volumen de Columna), luego 5% de B a 70% de B dentro de 60 C.V. La composición se mantuvo durante 15 C.V. al 95% de B, y luego regresó al 5% de B en 5 C.V. y se mantuvo a 5% B durante 10 C.V. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 120 C.V. Caudal de 6,0 mL/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 254 nm. Columna: Agilent AX1372-1 SF10-5.5gC8.

15 La HPLC preparativa se llevó a cabo de la siguiente manera: Se realizó una cromatografía líquida de rendimiento ultraalto (UPLC) de fase inversa en columnas Phenomenex Gemini NX 5 μ C-18, con las siguientes dimensiones: 150 x 4,6 mm para el análisis y 150 x 21,20 mm para el trabajo preparativo. Todos los experimentos de UPLC se realizaron con condiciones de gradiente. Los eluyentes utilizados eran disolvente A (H₂O con 0,1% de ácido fórmico) y disolvente B (CH₃CN con 0,1% de ácido fórmico). Los caudales utilizados eran 1,0 ml/min para la analítica y 20,0 ml/min para la HPLC preparativa. La detección se realizó a 254 y 280 nm.

B. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL1 (Ruta 1)



20

(a) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxycarbonil)fenoxi]propano (3)

25 Se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (71,3 mL, 73,2 g, 362 mmol) durante un período de 60 minutos a una solución con agitación suspendida de vainillato de metilo 2 (60,0 g, 329 mmol) y Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) en THF anhidro (800 mL) a 0-5°C (hielo/acetona) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se siguió agitando a 0-5°C durante 1 hora adicional, después de lo cual se añadió gota a gota una solución de 1,3-propanodiol (11,4 mL, 12,0 g, 158 mmol) en THF (12 mL) durante un período de 20 min. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 5 días. El precipitado blanco resultante **3** se recogió por filtración al vacío, se lavó con THF y se secó en un desecador al vacío hasta alcanzar un peso constante. Rendimiento = 54,7 g (84% basado en 1,3-propanodiol). Pureza satisfactoria por LC/MS (3,20 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 427 ([M + Na]⁺, 10); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,64 (dd, 2H, *J* = 1,8, 8,3 Hz), 7,54 (d, 2H, *J* = 1,8 Hz), 6,93 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 4,30 (t, 4H, *J* = 6,1 Hz), 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, *J* = 6,0 Hz).

30

(b) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxycarbonil)-5-nitrofenoxi]propano (4)

35 Cu(NO₃)₂·3H₂O sólido se añadió lentamente (81,5 g, 337,5 mmol) a una suspensión agitada en suspensión del biséster **3** (54,7 g, 135 mmol) en anhídrido acético (650 mL) a 0-5°C (hielo/acetona). La mezcla de reacción se siguió agitando durante 1 hora a 0-5°C y luego se permitió calentar hasta temperatura ambiente. Una leve exotermia (aprox. 40-50°C), acompañada de espesamiento de la mezcla y evolución de NO₂ se observó en esta etapa. Se añadió anhídrido acético adicional (300 mL) y la mezcla de reacción se siguió agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo (~1,5 L), se agitó y se dejó que volviera a la temperatura ambiente. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración al vacío y se secó en un desecador para propor-

cionar el compuesto *bis*-nitro **4** deseado como un sólido amarillo. Rendimiento = 66,7 g (100%). Pureza satisfactoria por LC/MS (3,25 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 517 ($[M + Na]^+$, 40); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45-2,40 (m, 2H).

(c) *1,3'-Bis(4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi)propano (5)*

5 Una suspensión del éster metílico **4** (66,7 g, 135 mmol) en THF (700 mL) se trató con NaOH 1 N (700 mL) y la mezcla de reacción se siguió agitando vigorosamente a temperatura ambiente. Después de 4 días de agitación, la suspensión se convirtió en una solución de color oscuro que se sometió a evaporación rotatoria a presión reducida para eliminar el THF. El residuo acuoso resultante se acidificó a pH 1 con HCl concentrado y el precipitado incoloro **5** se recogió y se secó completamente en un horno de vacío (50°C). Rendimiento = 54,5 g (87%). Pureza satisfactoria por LC/MS (2,65 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 489 ($[M + Na]^+$, 30)); 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,85 (s, 6H), 2,30-2,26 (m, 2H).

(d) *1,1'-[[[(Propano-1,3-diil)dioxi]bis[(5-metoxi-2-nitro-1,4-fenilen)carbonil]]bis [(2S, 4R)-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato] (6)*

15 Se añadió cloruro de oxalilo (24,5 mL, 35,6 g, 281 mmol) a una suspensión agitada del ácido nitrobenzoico **5** (43 g, 92,3 mmol) y DMF (6 mL) en DCM anhidro (600 mL). Después de una efervescencia inicial, la suspensión de la reacción se convirtió en una solución y la mezcla se siguió agitando a temperatura ambiente durante 16 horas. La conversión al cloruro de ácido se confirmó tratando una muestra de la mezcla de reacción con MeOH y el éster *bis*-metílico resultante se observó por LC/MS. La mayoría del disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida; la solución concentrada resultante se volvió a disolver en una cantidad mínima de DCM seco y se trituró con éter dietílico. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico frío y se secó durante 1 hora en un horno de vacío a 40°C. El cloruro de ácido sólido se añadió en porciones durante un periodo de 25 minutos a una suspensión agitada de clorhidrato de (2S,4R)-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato (38,1 g, 210 mmol) y TEA (64,5 mL, g, 463 mmol) en DCM (400 mL) a -40°C (hielo seco/ CH_3CN). Inmediatamente, la reacción se completó según lo juzgado por LC/MS (2,47 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 721 ($[M + H]^+$, 100). La mezcla se diluyó con DCM (200 mL) y se lavó con HCl 1 N (300 mL), $NaHCO_3$ saturado (300 mL), salmuera (400 mL), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío para proporcionar el producto **6** puro como un sólido de color naranja (66,7 g, 100%), $[\alpha]^{25}_D = -46,1^\circ$ ($c = 0,47$, $CHCl_3$); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (rotámetros) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, $J = 11,1$ Hz), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) (rotámetros) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, $CHCl_3$) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm^{-1} ; MS (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 721 ($[M + H]^+$, 47), 388 (80); HRMS $[M + H]^+$ teórico $C_{31}H_{36}N_4O_{16}$ *m/z* 721,2199, encontrado (ES+) *m/z* 721,2227.

(e) *1,1'-[[[(Propano-1,3-diil)dioxi]bis(11aS,2R)-2-(hidroxi)-7-metoxi-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (7)*

35 **Método A:** Una solución del nitro-éster **6** (44 g, 61,1 mmol) en MeOH (2,8 L) se añadió a níquel Raney® recién comprado (~50 g de una suspensión al 50% en H_2O) y gránulos antigolpes en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 5 L. La mezcla se calentó a reflujo y luego se trató gota a gota con una solución de hidrato de hidrazina (21,6 mL, 22,2 g, 693 mmol) en MeOH (200 mL), momento en el que se observó una fuerte efervescencia. Cuando se completó la adición (~ 45 min), se añadió cuidadosamente níquel Raney® adicional hasta que cesó la efervescencia y se descargó el color amarillo inicial de la mezcla de reacción. La mezcla se calentó a reflujo durante 5 minutos más, momento en el que se consideró que la reacción se había completado por TLC (90:10 v/v de $CHCl_3/MeOH$) y LC/MS (2,12 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 597 ($[M + H]^+$, 100)). La mezcla de reacción se filtró en caliente inmediatamente a través de un embudo de sinterización que contenía celite con succión al vacío. El material filtrado se redujo en volumen por evaporación al vacío y en ese momento se formó un precipitado incoloro que se recogió por filtración y se secó en un desecador de vacío para proporcionar **7** (31 g, 85%). $[\alpha]^{27}_D = +40,4^\circ$ ($c = 0,10$, DMF); 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10,2 (s, 2H, NH), 7,26 (s, 2H), 6,73 (s, 2H), 5,11 (d, 2H, $J = 3,98$ Hz, OH), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,19-4,07 (m, 6H), 3,78 (s, 6H), 3,62 (dd, 2H, $J = 12,1$, 3,60 Hz), 3,43 (dd, 2H, $J = 12,0$, 4,72 Hz), 2,67-2,57 (m, 2H), 2,26 (p, 2H, $J = 5,90$ Hz), 1,99-1,89 (m, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 169,1, 164,0, 149,9, 144,5, 129,8, 117,1, 111,3, 104,5, 54,8, 54,4, 53,1, 33,5, 27,5; IR (ATR, neat) 3438, 1680, 1654, 1610, 1605, 1516, 1490, 1434, 1379, 1263, 1234, 1216, 1177, 1156, 1115, 1089, 1038, 1018, 952, 870 cm^{-1} ; MS (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 619 ($[M + Na]^+$, 10), 597 ($[M + H]^+$, 52), 445 (12), 326 (11); HRMS $[M + H]^+$ teórico $C_{29}H_{32}N_4O_{10}$ *m/z* 597,2191, encontrado (ES+) *m/z* 597,2205.

55 **Método B:** Se añadió una suspensión de Pd/C al 10% (7,5 g, 10% p/p) en DMF (40 mL) a una solución del nitroéster **6** (75 g, 104 mmol) en DMF (360 mL). La suspensión se hidrogenó en un aparato de hidrogenación Parr durante 8 horas. El progreso de la reacción se controló mediante LC/MS después de que se detuviera la captación de hidrógeno. El Pd/C sólido se retiró por filtración y el material filtrado se concentró por evaporación rotatoria a vacío (por debajo de 10 mbar) a 40°C para proporcionar un aceite oscuro que contenía trazas de DMF y carbón residual. El residuo se digirió en EtOH (500 mL) a 40°C en un baño de agua (baño de evaporador rotatorio) y la suspensión resultante se filtró a través de celite y se lavó con etanol (500 mL) para proporcionar un filtrado claro. Se añadió hidrato de hidrazina (10 mL, 321 mmol) a la solución y la mezcla de reacción se calentó a reflujo. Después de 20

minutos, se observó la formación de un precipitado blanco y se dejó continuar el reflujo durante 30 minutos más. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter dietílico (2:1 de volumen de precipitado) y se secó en un desecador de vacío para proporcionar **7** (50 g, 81%). Datos analíticos del método B: idénticos a los obtenidos en el método A (rotación óptica, ¹H NMR, LC/MS y TLC).

5 (f) 1,1'-[[*(Propano-1,3-diol)dioxi*]bis(11a*S*,2*R*)-2-(*terc-butildimetilsililo*xi)-7-metoxi-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**8**)

Se añadieron TBSCl (27,6 g, 182,9 mmol) e imidazol (29,9 g, 438,8 mmol) a una solución turbia de tetralactama **7** (21,8 g, 36,6 mmol) en DMF anhidro (400 mL) a 0°C (hielo/acetona). La mezcla se siguió agitando bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas, momento después del cual la reacción se consideró completa según lo juzgado por LC/MS (3,90 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 825 ([*M* + *H*]⁺, 100). La mezcla de reacción se vertió en hielo (~1,75 L) y se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación. El precipitado blanco resultante se recogió por filtración al vacío, se lavó con H₂O, éter dietílico y se secó en el desecador de vacío para proporcionar **8** puro (30,1 g, 99%). [α]_D²³ = +234° (*c* = 0,41, CHCl₃); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (s, 2H, *NH*), 7,44 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 4,50 (p, 2H, *J* = 5,38 Hz), 4,21-4,10 (m, 6H), 3,87 (s, 6H), 3,73-3,63 (m, 4H), 2,85-2,79 (m, 2H), 2,36-2,29 (m, 2H), 2,07-1,99 (m, 2H), 0,86 (s, 18H), 0,08 (s, 12H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 165,7, 151,4, 146,6, 129,7, 118,9, 112,8, 105,3, 69,2, 65,4, 56,3, 55,7, 54,2, 35,2, 28,7, 25,7, 18,0, -4,82 y -4,86; IR (ATR, CHCl₃) 3235, 2955, 2926, 2855, 1698, 1695, 1603, 1518, 1491, 1446, 1380, 1356, 1251, 1220, 1120, 1099, 1033 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 825 ([*M* + *H*]⁺, 62), 721 (14), 440 (38); HRMS [*M* + *H*]⁺ teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₀Si₂ *m/z* 825,3921, encontrado (ES⁺) *m/z* 825,3948.

20 (g) 1,1'-[[*(Propano-1,3-diol)dioxi*]bis(11a*S*,*R*)-2-(*terc-butildimetilsililo*xi)-7-metoxi-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**9**)

Una solución de n-BuLi (68,3 ml de una solución 1,6 M en hexano, 109 mmol) se añadió gota a gota a una suspensión agitada de tetralactama **8** (30,08 g, 36,4 mmol) en THF anhidro (600 mL) a -30°C (hielo seco/etilenglicol) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se siguió agitando a esta temperatura durante 1 hora (ahora de color naranja rojizo), momento en el que se añadió gota a gota una solución de SEMC1 (19,3 mL, 18,2 g, 109 mmol) en THF anhidro (120 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se consideró completada según lo juzgado por TLC (EtOAc) y LC/MS (4,77 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1085 ([*M* + *H*]⁺, 100). El THF se eliminó por evaporación al vacío y el residuo resultante se disolvió en EtOAc (750 mL), se lavó con H₂O (250 mL), salmuera (250 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar la tetralactama **9** cruda protegida con N10-SEM como un aceite (max^m 39,5 g, 100%). El producto continuó a la siguiente etapa sin purificación. [α]_D²³ = +163° (*c* = 0,41, CHCl₃); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,22 (s, 2H), 5,47 (d, 2H, *J* = 9,98 Hz), 4,68 (d, 2H, *J* = 9,99 Hz), 4,57 (p, 2H, *J* = 5,77 Hz), 4,29-4,19 (m, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,79-3,51 (m, 8H), 2,87-2,81 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, *J* = 5,81 Hz), 2,03-1,90 (m, 2H), 1,02-0,81 (m, 22H), 0,09 (s, 12H), 0,01 (s, 18H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 165,7, 151,2, 147,5, 133,8, 121,8, 111,6, 106,9, 78,1, 69,6, 67,1, 65,5, 56,6, 56,3, 53,7, 35,6, 30,0, 25,8, 18,4, 18,1, -1,24, -4,73; IR (ATR, CHCl₃) 2951, 1685, 1640, 1606, 1517, 1462, 1433, 1360, 1247, 1127, 1065 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1113 ([*M* + *Na*]⁺, 48), 1085 ([*M* + *H*]⁺, 100), 1009 (5), 813 (6); HRMS [*M* + *H*]⁺ teórico C₅₃H₈₈N₄O₁₂Si₄ *m/z* 1085,5548, encontrado (ES⁺) *m/z* 1085,5542.

40 (h) 1,1'-[[*(Propano-1,3-diol)dioxi*]bis(11a*S*,2*R*)-2-hidroxi-7-metoxi-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**10**)

Se añadió una solución de TBAF (150 ml de una solución 1,0 M en THF, 150 mmol) a una solución agitada del éter bis-silílico **9** crudo [84,0 g (max^m 56,8 g), 52,4 mmol] en THF (800 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 1 hora, el análisis de la mezcla de reacción por TLC (95:5 v/v de CHCl₃/MeOH) reveló la finalización de la reacción. El THF se eliminó por evaporación a presión reducida a temperatura ambiente y el residuo resultante se disolvió en EtOAc (500 mL) y se lavó con NH₄Cl (300 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (60 mL), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el producto crudo. Una purificación mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: 100% de CHCl₃ a 96:4 v/v de CHCl₃/MeOH) proporcionó la tetralactama **10** pura como una espuma blanca (36,0 g, 79%). LC/MS 3,33 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 879 ([*M* + *Na*]⁺, 100), 857 ([*M* + *H*]⁺, 40); [α]_D²³ = +202° (*c* = 0,34, CHCl₃); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (s, 2H), 7,20 (s, 2H), 5,44 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,72 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,61-4,58 (m, 2H), 4,25 (t, 4H, *J* = 5,83 Hz), 4,20-4,16 (m, 2H), 3,91-3,85 (m, 8H), 3,77-3,54 (m, 6H), 3,01 (s, 2H, *OH*), 2,96-2,90 (m, 2H), 2,38 (p, 2H, *J* = 5,77 Hz), 2,11-2,05 (m, 2H), 1,00-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 169,5, 165,9, 151,3, 147,4, 133,7, 121,5, 111,6, 106,9, 79,4, 69,3, 67,2, 65,2, 56,5, 56,2, 54,1, 35,2, 29,1, 18,4, -1,23; IR (ATR, CHCl₃) 2956, 1684, 1625, 1604, 1518, 1464, 1434, 1361, 1238, 1058, 1021 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 885 ([*M* + 29]⁺, 70), 857 ([*M* + *H*]⁺, 100), 711 (8), 448 (17); HRMS [*M* + *H*]⁺ teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₂Si₂ *m/z* 857,3819, encontrado (ES⁺) *m/z* 857,3826.

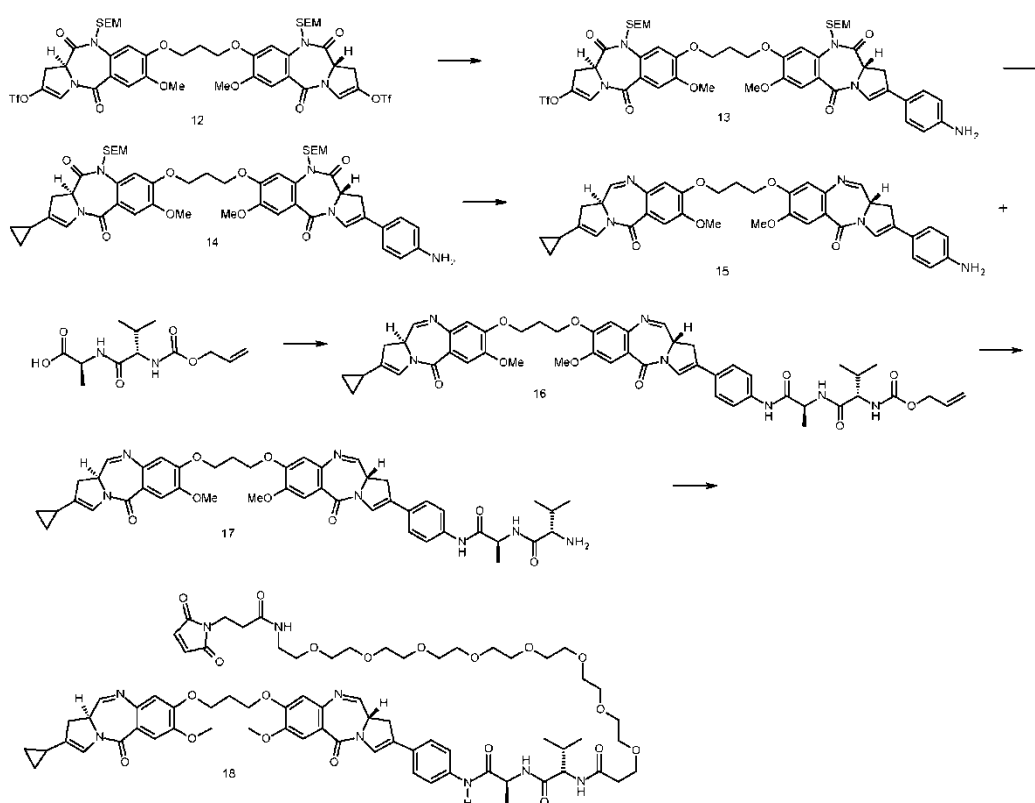
(i) 1,1'-[[*(Propano-1,3-diol)dioxi*]bis(11a*S*)-7-metoxi-2-oxo-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**11**)

Diol **10** (25,6 g, 30 mmol, 1 eq.), NaOAc (6,9 g, 84 mmol, 2,8 eq.) y TEMPO (188 mg, 1,2 mmol, 0,04 eq.) se disolvie-

ron en DCM (326 mL) bajo Ar. Esto se enfrió a -8°C (temperatura interna) y se añadió TCCA (9,7 g, 42 mmol, 1,4 eq.) en porciones durante 15 minutos. TLC (EtOAc) y LC/MS [3,60 min. (ES+) m/z (intensidad relativa) 854,21 ($[M + H]^+$, 40), (ES-) m/z (intensidad relativa) 887,07 ($[M - H + Cl]^-$, 10)] después de 30 minutos indicaban que la reacción se había completado. Se añadió DCM frío (200 mL) y la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite antes de lavar con una solución de hidrogenocarbonato de sodio saturado/tiosulfato de sodio (1:1 v/v; 200 mL x 2). La capa orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente al vacío para proporcionar una esponja amarilla/naranja (25,4 g, 99%). LC/MS [3,60 min. (ES+) m/z (intensidad relativa) 854,21 ($[M + H]^+$, 40); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +291^{\circ}$ ($c = 0,26$, CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,32 (s, 2H), 7,25 (s, 2H), 5,50 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,75 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,60 (dd, 2H, $J = 9,85, 3,07$ Hz), 4,31-4,18 (m, 6H), 3,89-3,84 (m, 8H), 3,78-3,62 (m, 4H), 3,55 (dd, 2H, $J = 19,2, 2,85$ Hz), 2,76 (dd, 2H, $J = 19,2, 9,90$ Hz), 2,42 (p, 2H, $J = 5,77$ Hz), 0,98-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 206,8, 168,8, 165,9, 151,8, 148,0, 133,9, 120,9, 111,6, 107,2, 78,2, 67,3, 65,6, 56,3, 54,9, 52,4, 37,4, 29,0, 18,4, -1,24; IR (ATR, CHCl_3) 2957, 1763, 1685, 1644, 1606, 1516, 1457, 1434, 1360, 1247, 1209, 1098, 1066, 1023 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 881 ($[M + 29]^+$, 38), 853 ($[M + H]^+$, 100), 707 (8), 542 (12); HRMS $[M + H]^+$ teórico $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_2$ m/z 853,3506, encontrado (ES+) m/z 853,3502.

(j) **1,1'-[[[(Propano-1,3-diol)dioxi]bis(11aS)-7-metoxi-2-[[trifluorometil]sulfonil]oxi]-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrolol[2,7-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (12)**

Se inyectó 2,6-lutidina anhidra (5,15 mL, 4,74 g, 44,2 mmol) en una porción en una solución de bis-cetona **11** agitada vigorosamente (6,08 g, 7,1 mmol) en DCM seco (180 mL) a -45°C (hielo seco/acetónitrilo) bajo una atmósfera de nitrógeno. El anhídrido tríflico anhidro, tomado de una ampolla recién abierta (7,2 mL, 12,08 g, 42,8 mmol), se inyectó rápidamente gota a gota, mientras se mantenía la temperatura a -40°C o menos. La mezcla de reacción se siguió agitando a -45°C durante 1 hora, momento en el que la TLC (50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc) reveló el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción fría se diluyó inmediatamente con DCM (200 mL) y, con agitación vigorosa, se lavó con agua (1 x 100 mL), solución de ácido cítrico al 5% (1 x 200 mL), NaHCO_3 saturado (200 mL), salmuera (100 mL) y se secó (MgSO_4). La filtración y la evaporación del disolvente a presión reducida proporcionaron el producto crudo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna (elución en gradiente: 90:10 v/v de *n*-hexano/EtOAc a 70:30 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar triflato de bis-enol **12** como una espuma amarilla (5,5 g, 70%). LC/MS 4,32 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1139 ($[M + \text{Na}]^+$, 20); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +271^{\circ}$ ($c = 0,18$, CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (s, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,14 (t, 2H, $J = 1,97$ Hz), 5,51 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,76 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,62 (dd, 2H, $J = 11,0, 3,69$ Hz), 4,32-4,23 (m, 4H), 3,94-3,90 (m, 8H), 3,81-3,64 (m, 4H), 3,16 (ddd, 2H, $J = 16,3, 11,0, 2,36$ Hz), 2,43 (p, 2H, $J = 5,85$ Hz), 1,23-0,92 (m, 4H), 0,02 (s, 18H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 167,1, 162,7, 151,9, 148,0, 138,4, 133,6, 120,2, 118,8, 111,9, 107,4, 78,6, 67,5, 65,6, 56,7, 56,3, 30,8, 29,0, 18,4, -1,25; IR (ATR, CHCl_3) 2958, 1690, 1646, 1605, 1517, 1456, 1428, 1360, 1327, 1207, 1136, 1096, 1060, 1022, 938, 913 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 1144 ($[M + 28]^+$, 100), 1117 ($[M + H]^+$, 48), 1041 (40), 578 (8); HRMS $[M + H]^+$ teórico $\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{Si}_2\text{S}_2\text{F}_6$ m/z 1117,2491, encontrado (ES+) m/z 1117,2465.



(a) Trifluorometanosulfonato de (S)-8-(3-(((S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ilo (**13**)

- 5 Pd(PPh₃)₄ (116,9 mg, 0,101 mmol) se añadió a una mezcla agitada del triflato de bis-enol **12** (5,65 g, 5,06 mmol), éster pinacólico de ácido 4-aminofenilborónico (1 g, 4,56 mmol), Na₂CO₃ (2,46 g, 23,2 mmol), MeOH (37 mL), tolueno (74 mL) y agua (37 mL). La mezcla de reacción se siguió agitando a 30°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, tiempo después del cual se consumió todo el éster borónico. La mezcla de reacción se evaporó luego hasta sequedad antes de que el residuo se recogiera en EtOAc (150 mL) y se lavara con H₂O (2 x 100 mL), salmuera (150 mL), se secara (MgSO₄), se filtrara y se evaporara a presión reducida para proporcionar el producto crudo. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: 80:20 v/v de Hexano/EtOAc a 60:40 v/v de Hexano/EtOAc) proporcionó el producto **13** como una espuma amarillenta (2,4 g, 45%). LC/MS 4,02 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1060,21 ([M + H]⁺, 100); ¹H-RMN: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,40 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 (s a, 3H), 7,24 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,15 (t, 1H, *J* = 2,0 Hz), 6,66 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,52 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,77 (d, 1H, *J* = 10,0 Hz), 4,76 (d, 1H, *J* = 10,0 Hz), 4,62 (dd, 1H, *J* = 3,7, 11,0 Hz), 4,58 (dd, 1H, *J* = 3,4, 10,6 Hz), 4,29 (t, 4H, *J* = 5,6 Hz), 4,00-3,85 (m, 8H), 3,80 - 3,60 (m, 4H), 3,16 (ddd, 1H, *J* = 2,4, 11,0, 16,3 Hz), 3,11 (ddd, 1H, *J* = 2,2, 10,5, 16,1 Hz), 2,43 (p, 2H, *J* = 5,9 Hz), 1,1-0,9 (m, 4H), 0,2 (s, 18H). ¹³C-RMN: (CDCl₃, 100 MHz) δ 169,8, 168,3, 164,0, 162,7, 153,3, 152,6, 149,28, 149,0, 147,6, 139,6, 134,8, 134,5, 127,9, 127,5, 125,1, 123,21, 121,5, 120,5, 120,1, 116,4, 113,2, 108,7, 79,8, 79,6, 68,7, 68,5, 67,0, 66,8, 58,8, 58,0, 57,6, 32,8, 32,0, 30,3, 19,7, 0,25.

- 20 (b) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11(10H,11aH)-diona (**14**)

- Trifenilarsina (0,24 g, 0,8 mmol), óxido de plata (I) (1,02 g, 4,4 mmol), ácido ciclopropilborónico (0,47 g, 5,5 mmol) y el material de partida **13** (1,15 g, 1,1 mmol) se disolvieron en dioxano (30 mL) bajo una atmósfera de argón. El fosfato de potasio tribásico (2,8 g, 13,2 mmol) se trituroó con un mortero y se añadió rápidamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se evacuó y se enjuagó con argón 3 veces y se calentó a 71°C. Se añadió *bis* (cloruro de benzonitrilo) paladio (III) (84 mg, 0,22 mmol) y el recipiente de la reacción se evacuó y se enjuagó con argón 3 veces. Después de 10 minutos, se tomó una pequeña muestra para el análisis por TLC (80:20 v/v de acetato de etilo/hexano) y LC/MS. Después de 30 minutos, la reacción se había completado (el análisis LC/MS indicaba el consumo completo del material de partida) y la reacción se filtró a través de celite y la almohadilla del filtro se lavó con acetato de etilo (400 mL). El material filtrado se lavó con agua (2 x 200 mL) y salmuera (2 x 200 mL). La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se retiró el disolvente al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (30:70 v/v de hexano/acetato de etilo) proporcionó el producto **14** como un sólido naranja/amarillo (0,66 g, 63%). Método 1, LC/MS (3,85 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 952,17 ([M + H]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,30 (s, 1H), 7,25 - 7,19 (m, 4H), 6,68 (s, 1H), 6,62 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 5,49 (dd,

2H, $J = 5,6, 10,0$ Hz), 4,73 (ap. t, 2H, $J = 10,8$ Hz), 4,54 (dd, 1H, $J = 3,2, 10,4$ Hz), 4,40 (dd, 1H, $J = 3,2, 10,4$ Hz), 4,29 - 4,23 (m, 4H), 3,91 - 3,85 (m, 7H), 3,80 - 3,71 (m, 2H), 3,70 - 3,61 (m, 2H), 3,38 - 3,32 (m, 1H), 3,12 - 3,01 (m, 1H), 2,50 - 2,69 (m, 1H), 2,40 (c, 2H, $J = 5,6$ Hz), 1,50 - 1,43 (m, 1H), 0,99 - 0,71 (m, 6H), 0,54 - 0,59 (m, 2H), 0,00 (s, 18H) ppm.

- 5 (c) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (**15**)

Dilactama SEM **14** (0,66 g, 0,69 mmol) se disolvió en THF (23 mL) y se enfrió a -78°C bajo una atmósfera de argón. Se añadió gota a gota una solución de Super-Hydride® (1,7 mL, 1 M en THF) durante 5 minutos mientras se controlaba la temperatura. Después de 20 minutos, se tomó una pequeña muestra y se lavó con agua para el análisis de LC/MS. Se añadió agua (50 mL) y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 mL). Las capas acuosas combinadas se lavaron con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO_4 , se filtraron y se eliminó el disolvente al vacío. El producto crudo se disolvió en MeOH (48 mL), CH_2Cl_2 (18 mL) y agua (6 mL) y se añadió suficiente gel de sílice para proporcionar una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (~ 200 mL) hasta que el producto dejó de ser eluido. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 70 mL), se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (100% de CHCl_3 a 96/4 v/v de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) proporcionó el producto **15** como un sólido amarillo (302 mg, 66%). Método 1, LC/MS (2,42 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 660,74 ([M+H]⁺, 30). ¹H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,86 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 7,78 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 7,58 - 7,44 (m, 3H), 7,34 - 7,20 (m, 3H), 6,88 - 6,66 (m, 4H), 4,35 - 4,15 (m, 6H), 3,95 - 3,75 (m, 7H), 3,39 - 3,22 (m, 1H), 3,14 - 3,04 (m, 1H), 2,93 - 2,85 (m, 1H), 2,46 - 2,36 (m, 2H), 1,49 - 1,41 (m, 1H), 0,80 - 0,72 (m, 2H), 0,58 - 0,51 (ap. s, 2H) ppm.

- 15 (d) ((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-Ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**16**)

25 En un matraz de fondo redondo desgasificado lleno de argón, se disolvieron HO-Ala-Val-alloc (149,6 mg, 0,549 mmol) y EEDQ (135,8 mg, 0,549 mmol) en una mezcla 9:1 de CH_2Cl_2 seco/MeOH (5 mL). El matraz se envolvió en una lámina de aluminio y la mezcla de reacción se siguió agitando a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir el material de partida **15** (302 mg, 0,457 mmol). La mezcla de reacción se siguió agitando durante 40 horas más a temperatura ambiente antes de que los compuestos volátiles se eliminaran por evaporación rotatoria a presión reducida (la reacción fue controlada por LC/MS, RT material de partida 2,32 min, (ES⁺ 660,29 ([M+H]⁺, 100)). El producto crudo se purificó directamente mediante una columna de cromatografía en gel de sílice (100% de CHCl_3 a 90/10 v/v de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) para proporcionar el producto puro (**16**) con un rendimiento del 42% (174 mg). Método 2 LC/MS (2,70 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 914,73 ([M+H]⁺, 60), 660,43 (60), 184,31 (100)).

- 30 (e) (2S)-2-amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**17**)

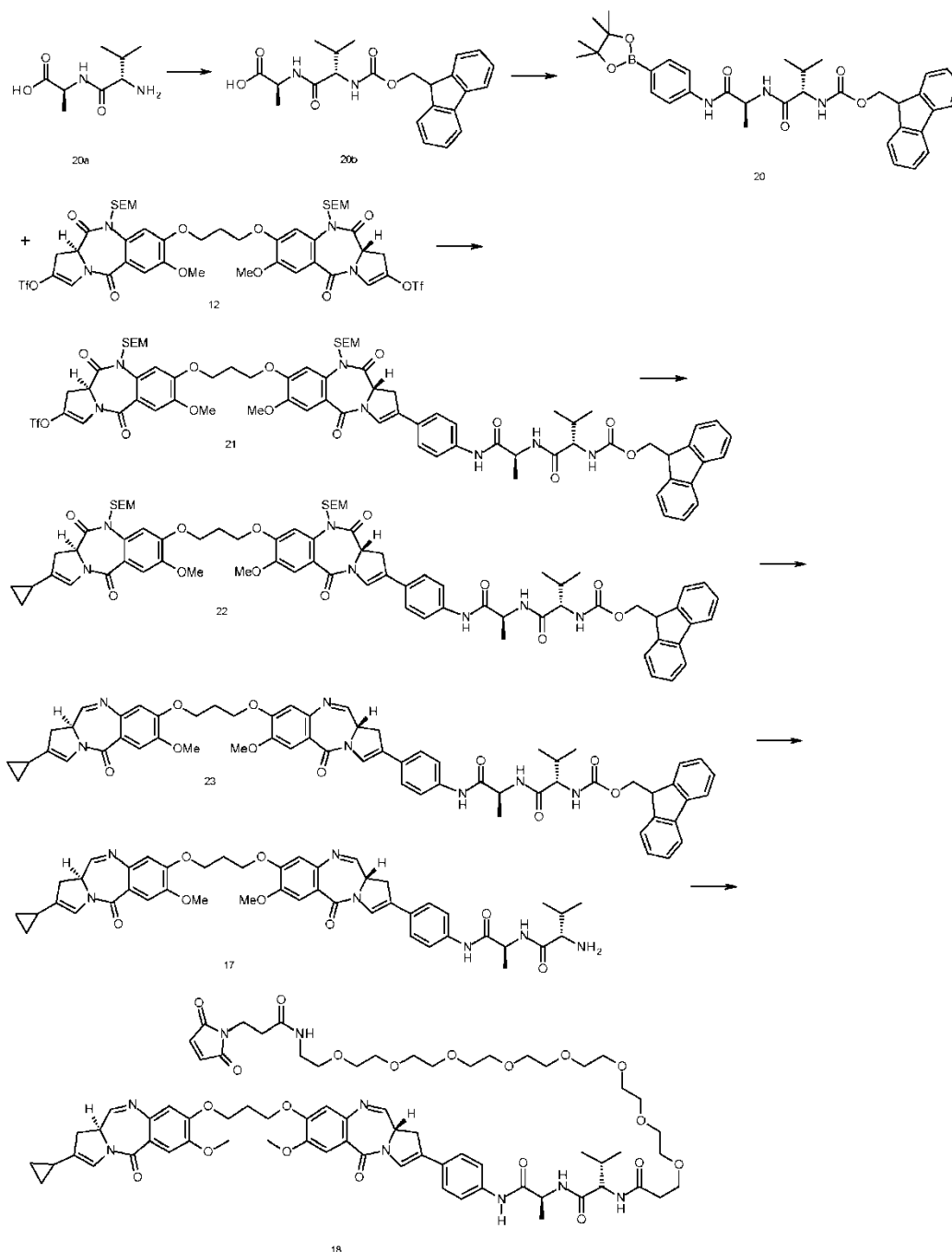
35 El material de partida **16** (170 mg, 0,185 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (5 mL) en un matraz de fondo redondo lleno de argón, antes de añadir pirrolidina (41 μl , 0,21 mmol). El matraz se purgó/se volvió a llenar tres veces con argón antes de añadir $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (14 mg, 0,084 mmol) y se repitió la operación de aclarado. Después de 1 hora, se observó el consumo completo del material de partida (la reacción fue controlada por LC/MS) y se añadió Et_2O (50 mL) a la mezcla de reacción, que se siguió agitando hasta que todo el producto precipitó en la solución. El sólido se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó dos veces con Et_2O (2 x 25 mL). El matraz de recogida se reemplazó y el sólido aislado se disolvió en CHCl_3 (100 mL o hasta que todo el producto había pasado por el embudo sinterizado). Los compuestos volátiles se eliminaron después por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **17** crudo que se usó directamente en la siguiente etapa (168 mg). LC/MS método 2 (2,70 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 830,27 ([M+H]⁺, 50), 660,13 (80), 171,15 (100)).

- 40 (f) N-((R)-1-(((S)-1-((4-(((S)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amida (**18** o **DL1**)

50 El material de partida **17** (154 mg, 0,185 mmol) y EDCI.HCl (110 mg, 0,185 mmol) se solubilizaron en CH_2Cl_2 seco (5 mL) en un matraz de fondo redondo, purgado y relleno de argón. La mezcla se siguió agitando a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir PEG₈-maleimida (35,6 mg, 0,185 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas más (o hasta que la reacción se completó, controlada por LC/MS). La solución de la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y los materiales orgánicos se lavaron con H_2O (50 mL) y salmuera (50 mL) antes de secarse con MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto crudo. Una purificación en cromatografía en columna de gel de sílice (100% de CHCl_3 a 85/15 v/v de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) proporcionó el producto deseado (135 mg), sin embargo, se observaron trazas de PEG₈-maleimida sin reaccionar (mediante LC/MS, 2,21 min, método 2). Una cromatografía en gel de sílice de fase inversa automati-

zada (H₂O/CH₃CN) (véase la información general para las condiciones) eliminó con éxito la impureza, proporcionando el producto final puro (**18**, 37 mg de producto puro a partir de 110 mg, 33%). Rendimiento global = 17%. Método 2 LC/MS (2,58 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1404,03 ([*M*+*H*]⁺, 20), 702,63 (100)). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,54 - 7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 - 6,68 (m, 2H), 4,74 - 4,62 (m, 1H), 4,45 - 4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 - 3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 - 3,07 (m, 1H), 2,92 (dd, *J* = 16,1, 4,1 Hz, 1H), 2,62 - 2,49 (m, 4H), 2,48 - 2,39 (m, 2H), 2,37 - 2,25 (m, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,52 - 1,44 (m, 3H), 1,10 - 0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), 0,57 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), NH no se observó.

10 C. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL1 (Ruta 2)



(a) Ácido (*R*)-2-((*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanoico (**20b**)

HO-Ala-Val-H **20a** (350 mg, 1,86 mmol) y Na₂CO₃ (493 mg, 4,65 mmol) se disolvieron en H₂O destilada (15 mL) y la mezcla se enfrió a 0°C antes de añadir dioxano (15 mL) (se produjo una precipitación parcial de la sal de aminoácido). Se añadió gota a gota una solución de Fmoc-Cl (504 mg, 1,95 mmol) en dioxano (15 mL) con agitación vigorosa

durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 2 horas antes de retirar el baño de hielo y la agitación se mantuvo durante 16 horas. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo se disolvió en agua (150 mL). El pH se ajustó de 9 a 2 con HCl 1N y la capa acuosa se extrajo posteriormente con EtOAc (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 mL), se secaron con MgSO₄, se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar HO-Ala-Val-Fmoc **20b** puro (746 mg, 97% de rendimiento). LC/MS 2,85 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 410,60; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, *J*=7,77 Hz, 2H), 7,60(d, *J*=7,77 Hz, 2H), 7,43(d, *J*=7,5 Hz, 2H), 7,34 (d, *J*=7,5 Hz, 2H), 6,30 (s a, 1H), 5,30 (s a, 1H), 4,71-7,56 (m, 1H), 4,54-4,36 (m, 2H), 4,08-3,91 (m, 1H), 2,21-2,07 (m, 1H), 1,50 (d, *J*=7,1 Hz, 3H), 1,06-0,90 (m, 6H).

5 (b) ((S)-3-Metil-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-1-((4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)amino)propan-2-il)amino)butan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**20**)

10 Se añadió éster pinacólico de ácido 4-aminofenilborónico (146,9 mg, 0,67 mmol) a una solución de HO-Ala-Val-Fmoc **20b** (330 mg, 0,8 mmol), DCC (166 mg, 0,8 mmol) y DMAP (5 mg, cat.) en DCM seco (8 mL) previamente agitado durante 30 minutos a temperatura ambiente en un matraz aclarado con argón. La mezcla de reacción se siguió agitando después a temperatura ambiente durante la noche. La reacción siguió con LCMS y TLC. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y los compuestos orgánicos se lavaron con H₂O y salmuera antes de secarlos con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se cargó en seco en una columna de cromatografía en gel de sílice (hexano/EtOAc, 6:4) y el producto **20** puro se aisló como un sólido blanco con un rendimiento del 88% (360 mg).

20 (c) Trifluorometanosulfonato de 8-(3-((2-(4-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ilo (**21**)

25 Bis-triflato **12** (2,03 g, 1,81 mmol), éster pinacólico de ácido borónico (1 g, 1,63 mmol) y Na₂CO₃ (881 mg, 8,31 mmol) se disolvieron en una mezcla de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (40 mL). El matraz de reacción se purgó y se llenó con argón tres veces antes de añadir tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (41 mg, 0,035 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 30°C durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se recogió en H₂O (100 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 mL), se secaron con MgSO₄, se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/EtOAc, 8:2 a 25:75) para proporcionar **21** puro con un 33% de rendimiento (885 mg). LC/MS 3,85 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1452,90; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 - 7,16 (m, 17H), 7,13 (s, 1H), 6,51 - 6,24 (m, 1H), 5,51 (dd, *J* = 10,0, 5,1 Hz, 2H), 5,36 - 5,11 (m, 1H), 4,74 (dd, *J* = 10,1, 4,4 Hz, 2H), 4,70 - 4,53 (m, 2H), 4,47 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,37 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,27 (m, 4H), 4,20 - 4,14 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,77 (ddd, *J* = 16,7, 9,0, 6,4 Hz, 3H), 3,71 - 3,61 (m, 2H), 3,24 - 2,91 (m, 3H), 2,55 - 2,33 (m, 2H), 2,22 - 2,07 (m, 1H), 1,52 - 1,37 (m, 3H), 1,04 - 0,86 (m, 10H), 0,00 (s, 18H).

30 (d) (9H-Fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (**22**)

35 Se añadió trifenilarsina (42 mg, 0,137 mmol) a una mezcla de triflato de PBD **21** (250 mg, 0,172 mmol), ácido ciclopropilborónico (73,9 mg, 0,86 mmol), óxido de plata (159 mg, 0,688 mmol) y fosfato de potasio tribásico (438 mg, 2,06 mmol) en dioxano seco (10 mL) bajo una atmósfera de argón. La reacción se aclaró con argón 3 veces y se añadió cloruro de bis(benzonitrilo)paladio(II) (13,2 mg, 0,034 mmol). La reacción se aclaró con argón 3 veces más antes de calentar a 75°C y agitar durante 10 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite que posteriormente se aclaró con acetato de etilo. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; 1% de metanol/cloroforno). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron, y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **22** deseado (132 mg, 50% de rendimiento). LC/MS 3,83 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1345,91; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 - 7,14 (m, 17H), 6,69 (s, 1H), 6,45 - 6,25 (m, 1H), 5,57 - 5,41 (m, 2H), 5,34 - 5,14 (m, 1H), 4,78 - 4,67 (m, 2H), 4,62 - 4,55 (m, 1H), 4,50 - 4,45 (m, 2H), 4,51 - 4,44 (m, 1H), 4,31 - 4,21 (m, 4H), 4,16 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,82 - 3,71 (m, 2H), 3,66 (m, 3H), 3,40 - 3,28 (m, 1H), 3,07 (m, 1H), 2,70 - 2,57 (m, 1H), 2,47 - 2,36 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,51 - 1,40 (m, 3H), 1,03 - 0,87 (m, 11H), 0,77 - 0,71 (m, 2H), 0,60 - 0,54 (m, 2H), 0,00 (t, *J* = 3,0 Hz, 18H).

50 (e) (9H-Fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (**23**)

55 Se añadió gota a gota una solución de Super-Hydride® (0,5 mL, 1 M en THF) a una solución de SEM dilactama **22** (265 mg, 0,19 mmol) en THF (10 mL) a -78°C bajo una atmósfera de argón. La adición se completó durante 5 minu-

tos para mantener constante la temperatura interna de la mezcla de reacción. Después de 20 minutos, se inactivó una parte alícuota con agua para el análisis de LC/MS, que reveló que la reacción se había completado. Se añadió agua (20 mL) a la mezcla de reacción y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se disolvió en MeOH (12 mL), CH₂Cl₂ (6 mL), agua (2 mL) y suficiente gel de sílice para formar una suspensión espesa y agitada. Después de 5 días, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (200 mL) hasta que se completó la elución del producto. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 70 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (100% de CHCl₃ a 96% de CHCl₃/4% de MeOH) proporcionó el producto **23** como un sólido amarillo (162 mg, 78%). LC/MS 3,02 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1052,37.

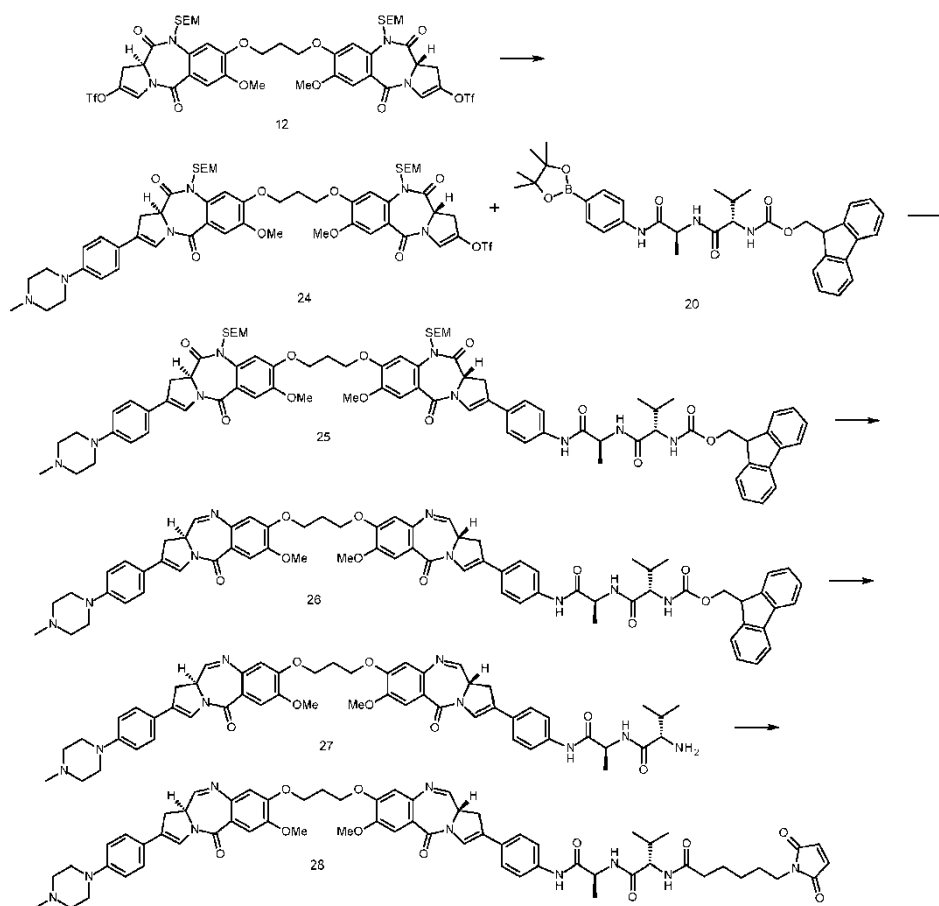
(f) (2S)-2-Amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**17**)

Se añadió un exceso de piperidina (0,2 mL, 2 mmol) a una solución de SEM-dilactama **23** (76 mg, 0,073 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla se siguió agitando a temperatura ambiente durante 20 minutos, momento en el que la reacción se había completado (según se verificó mediante LC/MS). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (75 mL) y la fase orgánica se lavó con H₂O (3x75 mL) hasta la eliminación completa de la piperidina. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para obtener un producto **17** crudo que fue utilizado como tal en la siguiente etapa. LC/MS 2,32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 830,00.

(g) N-((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-Ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amida (**18** o **DL 1**)

Se añadió clorhidrato de EDCI (14 mg, 0,0732 mmol) a una suspensión de maleimida-PEG₈-ácido (43,4 mg, 0,0732 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir PBD **17** (60,7 mg, 0,0732 mmol). La agitación se mantuvo hasta que se completó la reacción (generalmente 5 horas). La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con H₂O y salmuera antes de secar sobre MgSO₄, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto se purificó mediante una cromatografía cuidadosa en gel de sílice (elución lenta comenzando con 100% de CHCl₃ hasta 9:1 de CHCl₃/MeOH) seguida por cromatografía de fase inversa para eliminar la maleimida-PEG₈-ácido sin reaccionar. El producto **18 (DL1)** Se aisló en 17,6% (21,8 mg). LC/MS 2,57 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1405,30; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,54 - 7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 - 6,68 (m, 2H), 4,74 - 4,62 (m, 1H), 4,45 - 4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 - 3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 - 3,07 (m, 1H), 2,92 (dd, *J* = 16,1, 4,1 Hz, 1H), 2,62 - 2,49 (m, 4H), 2,48 - 2,39 (m, 2H), 2,37 - 2,25 (m, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,52 - 1,44 (m, 3H), 1,10 - 0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), 0,57 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), NH no se observaron.

40 D. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL2 (Ruta 1)



(a) Trifluorometanosulfonato de (S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-ilo (**24**)

- 5 Pd(PPh₃)₄ (20,6 mg, 0,018 mmol) se añadió a una mezcla agitada del triflato de bis-enol **12** (500 mg, 0,44 mmol), éster borónico de N-metil piperazina (100 mg, 0,4 mmol), Na₂CO₃ (218 mg, 2,05 mmol), MeOH (2,5 mL), tolueno (5 mL) y agua (2,5 mL). La mezcla de reacción se siguió agitando a 30°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, tiempo después del cual se consumió todo el éster borónico. La mezcla de reacción se evaporó luego hasta sequedad antes de que el residuo se recogiera en EtOAc (100 mL) y se lavara con H₂O (2 x 50 mL), salmuera (50 mL), se seca (MgSO₄), se filtrara y se evaporara a presión reducida para proporcionar el producto crudo. Una purificación mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: 80:20 v/v de Hexano/EtOAc a 60:40 v/v de Hexano/EtOAc) proporcionó el producto **24** como una espuma amarillenta (122,6 mg, 25%).

LC/MS 3,15 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1144 ([M + H]⁺, 20%).

- 15 (b) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-Metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**25**)

- 20 PBD-triflato **24** (359 mg, 0,314 mmol), éster pinacólico de ácido borónico **20** (250 mg, 0,408 mmol) y trietilamina (0,35 mL, 2,51 mmol) se disolvieron en una mezcla de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (3 mL). El recipiente del microondas se purgó y se llenó con argón tres veces antes de añadir tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (21,7 mg, 0,018 mmol) y la mezcla de reacción se colocó en el microondas a 80°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió CH₂Cl₂ (100 mL) y los extractos orgánicos se lavaron con agua (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL) antes de secar con MgSO₄, se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH, 100% a 9:1) para proporcionar **25** puro (200 mg, 43% de rendimiento). LC/MS 3,27 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1478 ([M + H]⁺, 100%).

- 25 (c) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-Metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**26**)

Se añadió gota a gota una solución de Super-Hydrate® (0,34 mL, 1 M en THF) a una solución de SEM-dilactama **25**

(200 mg, 0,135 mmol) en THF (5 mL) a -78°C bajo una atmósfera de argón. La adición se completó durante 5 minutos para mantener constante la temperatura interna de la mezcla de reacción. Después de 20 minutos, se inactivó una parte alícuota con agua para el análisis LC/MS, que reveló que la reacción se había completado. Se añadió agua (20 mL) a la mezcla de reacción y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron con MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se disolvió en MeOH (6 mL), CH_2Cl_2 (3 mL), agua (1 mL) y suficiente gel de sílice para formar una suspensión espesa en agitación. Después de 5 días, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (100 mL) hasta que se completó la elución del producto. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 mL), se secó con MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (100% de CHCl_3 al 96% de $\text{CHCl}_3/4\%$ de MeOH) proporcionó el producto **26** como un sólido amarillo (100 mg, 63%). LC/MS 2,67 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1186 ($[M + H]^+$, 5%).

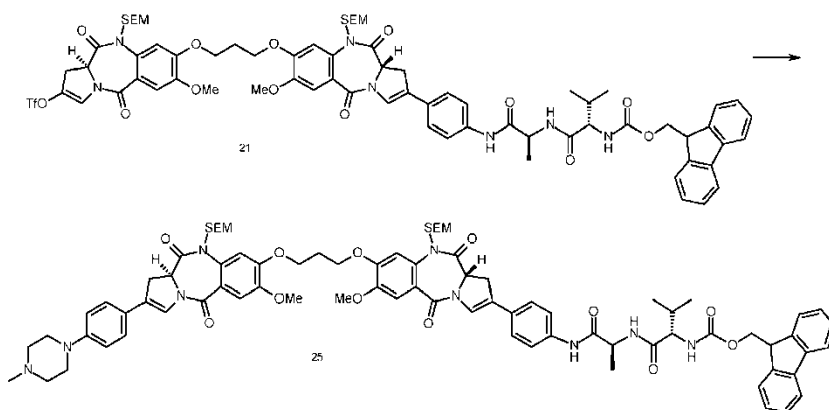
(d) (S)-2-Amino-N-((S)-[4-((R)-7-metoxi-8-(3-((R)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**27**)

Se añadió un exceso de piperidina (0,1 mL, 1 mmol) a una solución de PBD **26** (36,4 mg, 0,03 mmol) en DMF (0,9 mL). La mezcla se siguió agitando a temperatura ambiente durante 20 minutos, momento en el que la reacción se había completado (según se verificó mediante LC/MS). La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL) y la fase orgánica se lavó con H_2O (3 x 50 mL) hasta la eliminación completa de la piperidina. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para obtener un producto **27** crudo que fue utilizado como tal en la siguiente etapa. LC/MS 2,20 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 964 ($[M + H]^+$, 5%).

(e) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-((S)-1-((S)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**28** o **DL 2**).

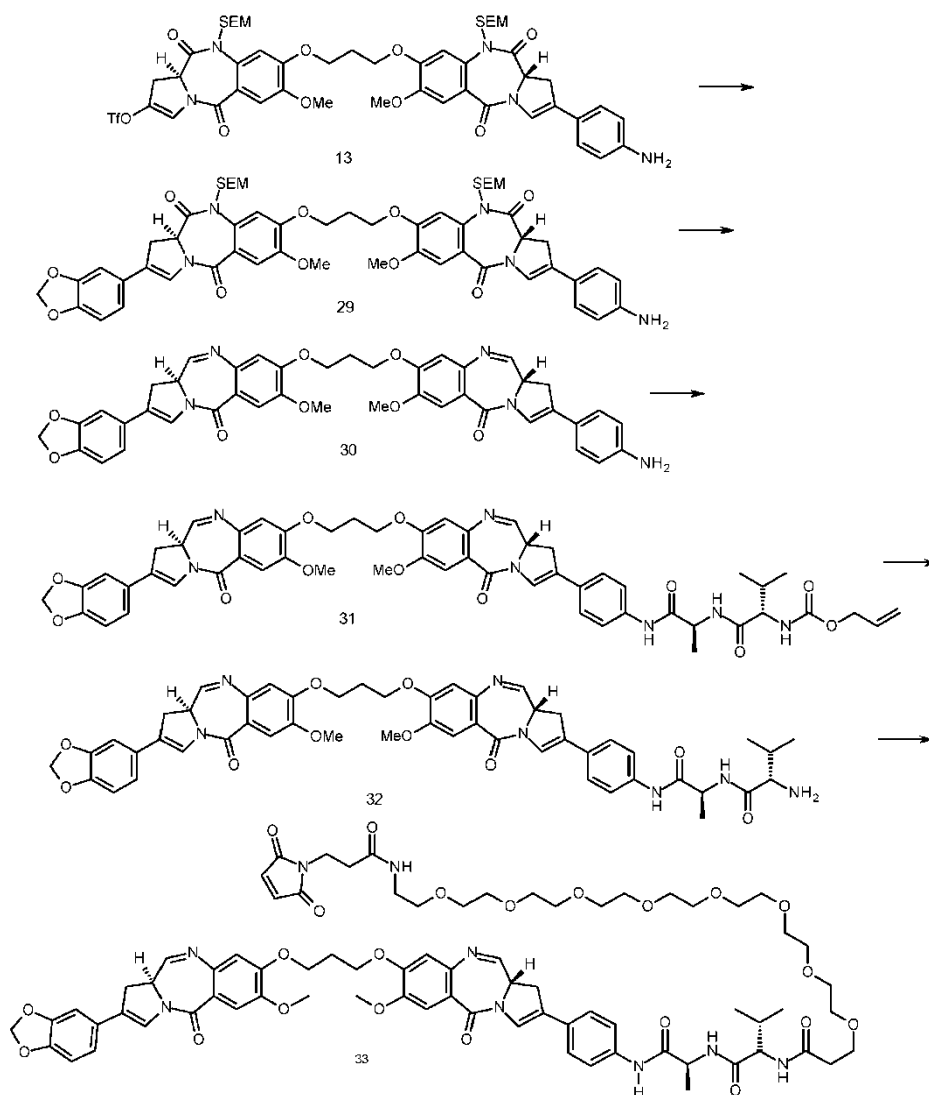
Se añadió clorhidrato de EDCI (4,7 mg, 0,03 mmol) a una suspensión de ácido 6-maleimido-hexanoico (6,5 mg, 0,03 mmol) en CH_2Cl_2 seco (3 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir PBD **27** (34 mg, crudo). La agitación se mantuvo hasta que se completó la reacción (6 horas). La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y la fase orgánica se lavó con H_2O y salmuera antes de secar sobre MgSO_4 , se filtró y un exceso de disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto se purificó mediante una cromatografía cuidadosa en gel de sílice (elución lenta comenzando con 100% de CHCl_3 hasta 9:1 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) seguida de cromatografía en fase inversa para eliminar maleimida-PEGg-ácido sin reaccionar. El producto **28** se aisló en un 41% en dos etapas (14,6 mg). LC/MS 2,40 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1157 ($[M + H]^+$, 5%).

E. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL2 (Ruta 2)



PBD-triflato **21** (469 mg, 0,323 mmol), éster pinacólico de ácido borónico (146,5 mg, 0,484 mmol) y Na_2CO_3 (157 mg, 1,48 mmol) se disolvieron en una mezcla de tolueno/MeOH/ H_2O , 2:1:1 (10 mL). El matraz de reacción se purgó con argón tres veces antes de añadir *tetrakis*(trifenilfosfina)paladio(0) (7,41 mg, 0,0064 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 30°C durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se recogió en H_2O (50 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 mL), se secaron con MgSO_4 , se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (100% de CHCl_3 a 95%:5% de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) para proporcionar **25** puro con un 33% de rendimiento (885 mg). LC/MS 3,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1478 ($[M + H]^+$, 100%).

F. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL3 (Ruta 1)



(a) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (**29**)

- 5 Ácido 3,4-(metilendioxi)fenil borónico (356 mg, 2,1 mmol, 1,3 equiv.), TEA (1,8 mL, 12,9 mmol, 8 equiv.) y triflato/anilina **13** (1,75 g, 1,7 mmol, 1 equiv.) se disolvieron en una mezcla de etanol (7 mL), tolueno (13 mL) y agua (2 mL) bajo una atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se evacuó y se aclaró con Ar 3 veces, antes de la adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (114 mg, 0,1 mmol, 0,06 equiv.). El matraz se evacuó de nuevo y se aclaró con Ar 3 veces y se calentó en un microondas a 80°C durante 8 minutos con 30 segundos de tiempo de agitación previa. El análisis por TLC (80:20 v/v de acetato de etilo/hexano) indicaba el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (50 mL) y se lavó con agua (50 mL). La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (60:40 a 20:80 v/v de hexano/acetato de etilo) proporcionó el producto **29** como un sólido amarillo (1,21 g, 71%). LC/MS (3,92 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 1032,44 ([M + H]⁺, 100).

- 15 (b) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5(11aH)-ona (**30**)

- Dilactama SEM **29** (0,25 g, 0,24 mmol, 1 equiv.) se disolvió en THF (8 mL) y se enfrió a -78°C bajo una atmósfera de Ar. Se añadió gota a gota Super-Hydrate® (0,6 mL, 1 M en THF, 2,5 equiv.) durante 5 minutos mientras se controlaba la temperatura. Después de 20 minutos, se tomó una pequeña muestra y se elaboró para el análisis de LCMS. Se añadió agua (50 mL), el baño frío se retiró y la solución se lavó con acetato de etilo (50 mL). La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. El producto crudo se disolvió en EtOH (15 mL), CH₂Cl₂ (7,5 mL) y se añadió agua (2,5 mL) y suficiente gel de sílice hasta tener una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 mL) hasta que el producto dejó de ser eluido. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x

50 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃ con 1% a 4% de gradiente de MeOH) proporcionó el producto **30** como un sólido amarillo (94 mg, 53%). LC/MS (2,53 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 739,64 ([M]⁺, 70).

5 (c) ((S)-1-(((S)-1-(4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**31**)

10 Bajo una atmósfera de Ar, se agitó Alanina-Valina-Alloc (180 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) con EEDQ (163 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (21 mL) y metanol (1 mL) durante 1 hora. El PBD **30** (407 mg, 0,55 mmol, 1 equiv.) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (21 mL) y metanol (1 mL) y se añadió a la reacción. La LC/MS después de 5 días de agitación a temperatura ambiente mostraba una formación de producto mayoritaria. El disolvente se eliminó al vacío antes de una purificación mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂ con un gradiente de MeOH del 1% al 6%) para producir el producto **31** como un sólido amarillo (184 mg, 34%). LC/MS (2,95 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 994,95 ([M + H]⁺, 60).

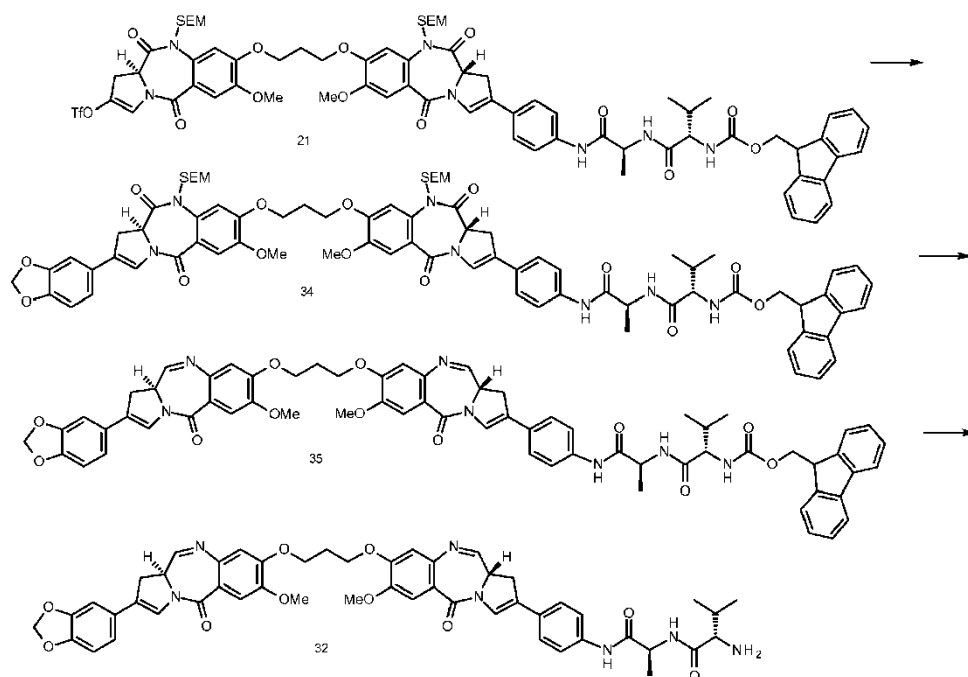
15 (d) (S)-2-Amino-N-((S)-1-(4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**32**)

20 La imina **31** (100 mg, 0,1 mmol, 1 equiv.) se disolvió en DCM anhidro (10 mL) (con la ayuda de una gota de metanol para ayudar a la disolución) bajo una atmósfera de Ar. Se añadió gota a gota pirrolidina (30 µl, 0,15 mmol, 1,5 equiv.) antes de que el matraz se evacuara y se aclarara con Ar tres veces. Se añadió Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 6 µmol, 0,06 equiv.) y el matraz se evacuó y se aclaró con Ar tres veces. El análisis de LC/MS después de 1 hora indicaba la formación del producto y la pérdida completa del material de partida. Se añadió Et₂O (60 mL) a la mezcla de reacción y se siguió agitando hasta que todo el producto había precipitado en la solución. El material precipitado se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó dos veces con Et₂O (2 x 20 mL). El matraz de recogida se reemplazó y el sólido aislado se disolvió y se lavó a través del sinter con CHCl₃ (100 mL). El disolvente se eliminó al vacío para obtener el producto **32** crudo como un sólido amarillo que se usó directamente en la siguiente etapa. LC/MS (1,14 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 910,40 ([M + H]⁺, 67).

30 (e) N-((S)-1-(((S)-1-(4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amida (**33** o **DL 3**)

35 La imina **32** (92 mg, 0,1 mmol, 1,1 equiv.) se disolvió en CHCl₃ (6 mL) con una gota de MeOH anhidro para ayudar a la disolución. Se añadió maleimida-PEG₈-ácido (53 mg, 0,09 mmol, 1 equiv.) seguido de EEDQ (33 mg, 0,14 mmol, 1,5 equiv.). A esto siguió una agitación vigorosa a temperatura ambiente bajo Ar durante 4 días hasta que el análisis LC/MS mostró una formación mayoritaria del producto. El disolvente se eliminó al vacío y el producto crudo se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃ con un gradiente de MeOH del 1% al 10%) produciendo **33** (81 mg). El material se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa para proporcionar **33** como un sólido amarillo (26,3 mg, 18%). Ejecución fórmica rápida: LC/MS (1,39 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1485,00 ([M + H]⁺, 64).

G. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL3 (Ruta 2)



(a) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de 9H-fluoren-9-il)metilo (**34**)

El triflato **21** (0,5 g, 0,35 mmol, 1 equiv., ácido 3,4-(metilendioxi)fenil borónico (75 mg, 0,45 mmol, 1,3 equiv.) y Na_2CO_3 (0,17 g, 1,6 mmol, 4,5 equiv.) se disolvieron en tolueno (11 mL), EtOH (5,5 mL) y agua (5,5 mL) bajo una atmósfera de Ar. El matraz se evacuó y se enjuagó tres veces con Ar. Se añadió $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (24 mg, 0,02 mmol, 0,06 equiv.) y nuevamente se evacuó el matraz y se enjuagó con Ar tres veces. Este se calentó a 30°C y se siguió agitando durante la noche. Un análisis con LC/MS mostró una pérdida completa del material de partida. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se disolvió en agua (60 mL) antes de lavar con acetato de etilo (60 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron con MgSO_4 , se filtraron y se eliminó el disolvente al vacío. Una purificación mediante cromatografía en columna (50:50 a 25:75 v/v de hexano/acetato de etilo) proporcionó el producto **34** como un sólido amarillo (310 mg, 64%). LC/MS (1,44 min (ES^-) m/z (intensidad relativa) 1423,35 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 79).

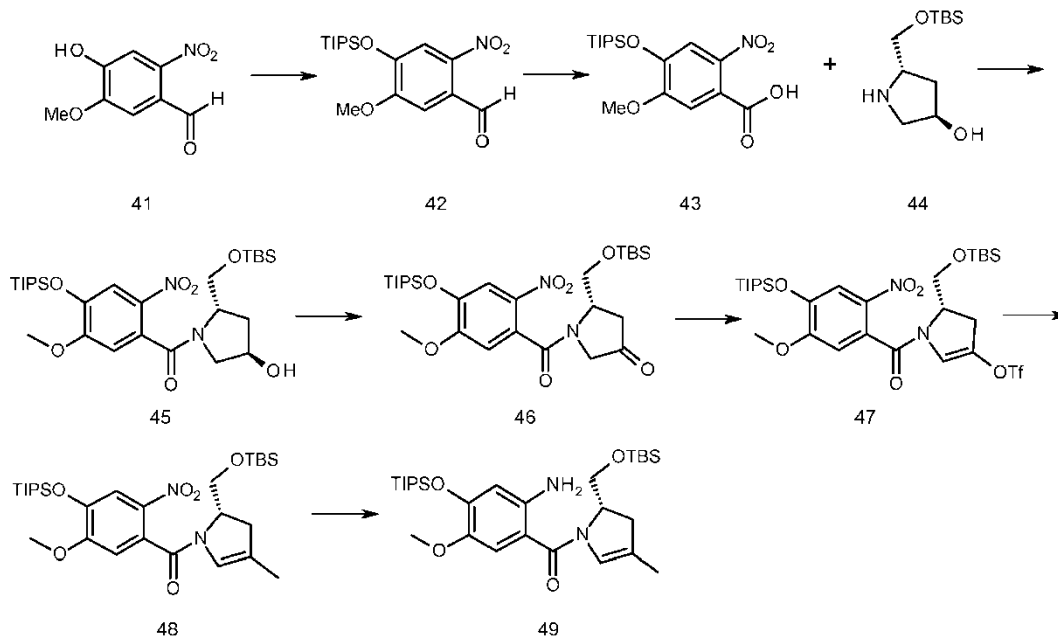
(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de 9H-fluoren-9-il)metilo (**35**)

Dilactama SEM **34** (0,31 g, 0,22 mmol, 1 equiv.) se disolvió en THF (10 mL) y se enfrió a -78°C bajo una atmósfera de Ar. Se añadió gota a gota Super-Hydríde® (0,5 mL, 1 M en THF, 2,5 equiv.) durante 5 minutos mientras se controlaba la temperatura. Después de 30 minutos, se tomó una pequeña muestra y se preparó para el análisis LC/MS. Se añadió agua (50 mL), el baño frío se retiró y la solución se lavó con acetato de etilo (50 mL). La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 mL), se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. El producto crudo se disolvió en EtOH (13,2 mL), CH_2Cl_2 (6,6 mL) y se añadió agua (2,2 mL) y suficiente gel de sílice hasta que se tuvo una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (100 mL) hasta que el producto dejó de eluir. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 mL), se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. Una purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl_3 con 1% a 4% de gradiente de MeOH) proporcionó el producto **35** puro como un sólido amarillo (185 mg, 75%). LC/MS (1,70 min (ES^+) m/z (intensidad relativa) 1132,85 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 60).

(c) (S)-2-Amino-N-((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**32**)

La imina **35** (82 mg, 0,07 mmol, 1 equiv.) se disolvió en DMF (1 mL) antes de que se añadiera lentamente piperidina (0,2 mL, 2 mmol, en exceso). Esta solución se siguió agitando a temperatura ambiente durante 20 minutos hasta que el análisis LC/MS mostró un consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL), se lavó con agua (50 mL x 4), se secó con MgSO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. El producto **33** se usó sin una purificación adicional en la siguiente etapa. LC/MS (1,15 min (ES^+) m/z (intensidad relativa) 910,60 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 58).

H. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL5

(i) (S)-(2-Amino-5-metoxi-4-((triospropilsilil)oxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (49)5 (a) *5-Metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)benzaldehído (42)*

Se añadió cloruro de triospropilsililo puro (56,4 mL, 262 mmol) a una mezcla de imidazol (48,7 g, 715,23 mmol) y 4-hidroxi-5-metoxi-2-nitrobenzaldehído **41** (47 g, 238 mmol) (molidos juntos). La mezcla se calentó hasta que el fenol y el imidazol se fundieron y se disolvieron (100°C). La mezcla de reacción se siguió agitando durante 15 minutos y luego se dejó enfriar, después de lo cual se observó que se formaba un sólido en el fondo del matraz (cloruro de imidazol). La mezcla de reacción se diluyó con 5% de EtOAc/hexanos y se cargó directamente sobre gel de sílice y la almohadilla se eluyó con 5% de EtOAc/hexanos, seguido de 10% de EtOAc/hexanos (debido al poco exceso, se encontró muy poco TIPSCl sin reaccionar en el producto). El producto deseado eluyó con acetato de etilo al 5% en hexano. El exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida, seguida de secado a alto vacío para proporcionar un sólido cristalino sensible a la luz (74,4 g, 88%). Pureza satisfactoria por LC/MS (4,22 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 353,88 [*M* + *H*]⁺, 100); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,43 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 1,35 - 1,24 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(b) *Ácido 5-metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)benzoico (43)*

Una solución de clorito de sodio (47,3 g, 523 mmol, 80% de calidad técnica) y dihidrogenofosfato de sodio monobásico (35,2 g, 293 mmol) (NaH₂PO₄) en agua (800 mL) se añadió a una solución de compuesto **2** (74 g, 209 mmol) en tetrahidrofurano (500 mL) a temperatura ambiente. Se añadió inmediatamente peróxido de hidrógeno (60% p/p, 140 mL, 2,93 mol) a la mezcla bifásica agitada vigorosamente. La mezcla de reacción desprendió gas (oxígeno), el material de partida se disolvió y la temperatura de la mezcla de reacción aumentó a 45°C. Después de 30 minutos, la LC/MS reveló que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico (1 M) para bajar el pH a 3 (esta etapa se consideró innecesaria en muchos casos, ya que el pH al final de la reacción ya era ácido; se debe controlar el pH antes de la extracción). La mezcla de reacción se extrajo luego con acetato de etilo (1 L) y las fases orgánicas se lavaron con salmuera (2 x 100 mL) y se secaron sobre sulfato de magnesio. La fase orgánica se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **43** en rendimiento cuantitativo como un sólido amarillo. LC/MS (3,93 min (ES-) *m/z* (intensidad relativa) 367,74 [*M* - *H*]⁻, 100); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 1,34 - 1,22 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(c) *((2S,4R)-2-(((Terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-hidroxipirrolidin-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)fenil)metanona (45)*

Se añadió DCC (29,2 g, 141 mmol, 1,2 eq) a una solución de ácido **3** (43,5 g, 117,8 mmol, 1 eq) e hidrato de hidroxibenzotriazol (19,8 g, 129,6 mmol, 1,1 eq) en diclorometano (200 mL) a 0°C. Se retiró el baño frío y se dejó que la reacción transcurriera durante 30 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual una solución de (2S,4R)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxipirrolidina **44** (30 g, 129,6 mmol, 1,1 eq) y trietilamina (24,66 mL, 176 mmol, 1,5 eq) en diclorometano (100 mL) se añadió rápidamente a -10°C bajo atmósfera de argón (a gran escala, el tiempo de

adición podría acortarse enfriando la mezcla de reacción incluso adicionalmente). La mezcla de reacción se siguió agitando a temperatura ambiente durante 40 minutos a 1 hora y se controló por LC/MS y TLC (EtOAc). Los sólidos se eliminaron por filtración sobre celite y la fase orgánica se lavó con HCl 0,1 M frío acuoso hasta que el pH se midió a 4 o 5. Después se lavó la fase orgánica con agua, seguida de bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente 40/60 de acetato de etilo/hexano a 80/20 de acetato de etilo/hexano). El exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para obtener el producto **45** puro, (45,5 g de producto puro al 66% y 17 g de producto ligeramente impuro, 90% en total). LC/MS 4,43 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 582,92 ($[M + H]^+$, 100); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,66 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,40 (s, 1H), 4,13 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,77 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,36 (dd, $J = 11,3, 4,5$ Hz, 1H), 3,14 - 3,02 (m, 1H), 2,38 - 2,28 (m, 1H), 2,10 (ddd, $J = 13,3, 8,4, 2,2$ Hz, 1H), 1,36 - 1,19 (m, 3H), 1,15 - 1,05 (m, 18H), 0,91 (s, 9H), 0,17 - 0,05 (m, 6H), (presencia de rotámeros).

(d) (S)-5-(((Terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)benzoil)pirrolidin-3-ona (**46**)

Se añadió TCCA (8,82 g, 40 mmol, 0,7 eq) a una solución agitada de **45** (31,7 g, 54 mmol, 1 eq) y TEMPO (0,85 g, 5,4 mmol, 0,1 eq) en diclorometano seco (250 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 20 minutos, momento en el que la TLC (50/50 de acetato de etilo/hexano) reveló un consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el material filtrado se lavó con bicarbonato de sodio saturado acuoso (100 mL), tiosulfato de sodio (9 g en 300 mL), salmuera (100 mL) y se secó sobre sulfato de magnesio. Una evaporación rotativa a presión reducida produjo el producto **46** en rendimiento cuantitativo. LC/MS 4,52 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 581,08 ($[M + H]^+$, 100);

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,78 - 7,60 (m, 1H), 6,85 - 6,62 (m, 1H), 4,94 (dd, $J = 30,8, 7,8$ Hz, 1H), 4,50 - 4,16 (m, 1H), 3,99 - 3,82 (m, 3H), 3,80 - 3,34 (m, 3H), 2,92 - 2,17 (m, 2H), 1,40 - 1,18 (m, 3H), 1,11 (t, $J = 6,2$ Hz, 18H), 0,97 - 0,75 (m, 9H), 0,15 - 0,06 (m, 6H), (presencia de rotámeros).

(e) Trifluorometanosulfonato de (S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-ilo (**47**)

Se inyectó anhídrido triflico (27,7 mL, 46,4 g, 165 mmol, 3 eq) (temperatura controlada) a una suspensión de cetona **46** agitada fuertemente (31,9 g, 55 mmol, 1 eq) en diclorometano seco (900 mL) en presencia de 2,6-lutidina (25,6 mL, 23,5 g, 220 mmol, 4 eq, secada sobre tamices) a -50°C (acetona/baño de hielo seco). La mezcla de reacción se siguió agitando durante 1,5 horas, hasta cuando la LC/MS, después de un minitratamiento (agua/diclorometano), reveló que la reacción se había completado. Se añadió agua a la mezcla de reacción aún fría y la capa orgánica se separó y se lavó con bicarbonato de sodio saturado, salmuera y sulfato de magnesio. La fase orgánica se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 10/90 v/v de acetato de etilo/hexano), la eliminación del exceso de eluyente produjo el producto **47** (37,6 g, 96%) LC/MS, método 2, 4,32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 712,89 ($[M + H]^+$, 100); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,71 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,05 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 4,78 (dd, $J = 9,8, 5,5$ Hz, 1H), 4,15 - 3,75 (m, 5H), 3,17 (ddd, $J = 16,2, 10,4, 2,3$ Hz, 1H), 2,99 (ddd, $J = 16,3, 4,0, 1,6$ Hz, 1H), 1,45 - 1,19 (m, 3H), 1,15 - 1,08 (m, 18H), 1,05 (s, 6H), 0,95 - 0,87 (m, 9H), 0,15 - 0,08 (m, 6H).

(f) (S)-(2-(((Terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((triospropilsilil)oxi)fenil)metanona (**48**)

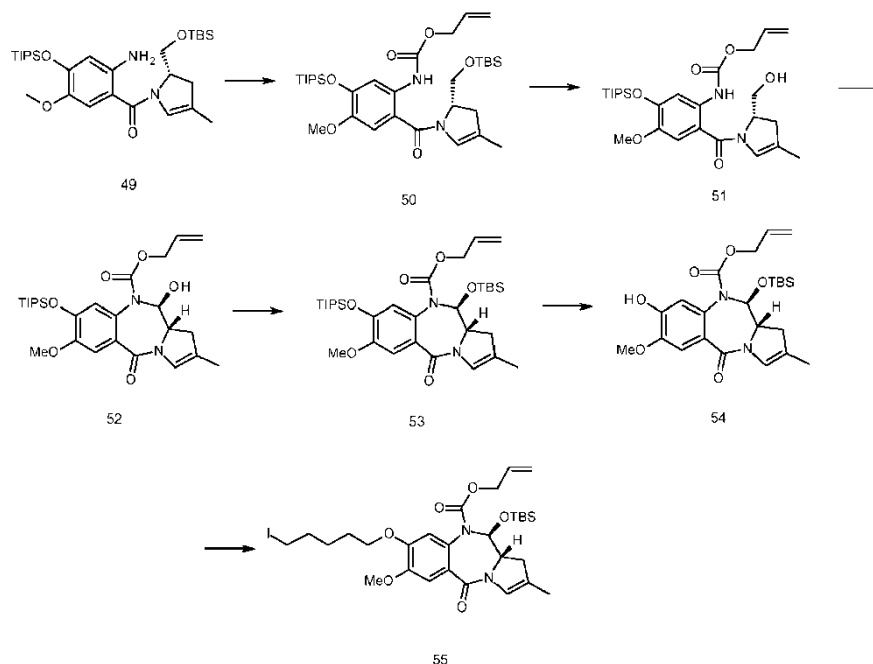
Se añadió trifenilarsina (1,71 g, 5,60 mmol, 0,4 eq) a una mezcla de triflato **47** (10,00 g, 14 mmol, 1 eq), ácido metilborónico (2,94 g, 49,1 mmol, 3,5 eq), óxido de plata (13 g, 56 mmol, 4 eq) y fosfato de potasio tribásico (17,8 g, 84 mmol, 6 eq) en dioxano seco (80 mL) bajo una atmósfera de argón. La reacción se aclaró con argón 3 veces y se añadió cloruro de bis(benzonitrilo)paladio(II) (540 mg, 1,40 mmol, 0,1 eq). La reacción se aclaró con argón 3 veces más antes de calentar ultrarrápidamente a 110°C (el bloque de calentamiento de DrySyn se había calentado previamente a 110°C antes de la adición del matraz). Después de 10 minutos, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de celite. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 10% de acetato de etilo/hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron, y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para obtener el producto **48** (4,5 g, 55%). LC/MS, 4,27 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 579,18 ($[M + H]^+$, 100); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,70 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 5,51 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,77 - 4,59 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 2,92 - 2,65 (m, 1H), 2,55 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 1,62 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H), 1,40 - 1,18 (m, 3H), 1,11 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,11 (d, $J = 2,3$ Hz, 6H).

(g) (S)-(2-Amino-5-metoxi-4-((triospropilsilil)oxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (**49**)

Se añadió polvo de zinc (28 g, 430 mmol, 37 eq) a una solución de compuesto **48** (6,7 g, 11,58 mmol) en ácido fórmico al 5% en etanol v/v (70 mL) a aproximadamente 15°C. La exotermia resultante se controló utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 30°C. Después de 30 minutos, la

mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. El material filtrado se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 10% de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **49** (5,1 g, 80%). LC/MS, 4,23 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 550,21 ($[M + H]^+$, 100); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,64 - 4,53 (m, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,87 (s, 1H), 3,77 - 3,69 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,71 - 2,60 (m, 1H), 2,53 - 2,43 (m, 1H), 2,04 - 1,97 (m, $J = 11,9$ Hz, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,26 - 1,13 (m, 3H), 1,08 - 0,99 (m, 18H), 0,82 (s, 9H), 0,03 - -0,03 (m, $J = 6,2$ Hz, 6H).

(ii) 11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-8-((5-yodopentil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo



(a) *(S)*-Alil(2-(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamato (**50**)

Se añadió cloroformiato de alilo (0,30 mL, 3,00 mmol, 1,1 eq) a una solución de amina **49** (1,5 g, 2,73 mmol) en presencia de piridina seca (0,48 mL, 6,00 mmol, 2,2 eq) en diclorometano seco (20 mL) a $-78^\circ C$ (baño de acetona/hielo seco). Después de 30 minutos, el baño se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se añadió sulfato de cobre acuoso saturado. La capa orgánica se lavó después secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **50** que se usó directamente en la siguiente reacción. LC/MS, 4,45 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 632,91 ($[M + H]^+$, 100)

(b) *(S)*-Alil(2-(2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamato (**51**)

El producto crudo **50** se disolvió en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (28:4:4:8 mL) y se siguió agitando a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la desaparición completa del material de partida se observó por LC/MS. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua (2 x 500 mL), bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 mL) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice, 25% de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **51** deseado (1 g, 71%). LC/MS, 3,70 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 519,13 ($[M + H]^+$, 95); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,34 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,15 (s, 1H), 5,95 (ddt, $J = 17,2, 10,5, 5,7$ Hz, 1H), 5,33 (dc, $J = 17,2, 1,5$ Hz, 1H), 5,23 (ddd, $J = 10,4, 2,6, 1,3$ Hz, 1H), 4,73 (tt, $J = 7,8, 4,8$ Hz, 1H), 4,63 (dt, $J = 5,7, 1,4$ Hz, 2H), 4,54 (s, 1H), 3,89 - 3,70 (m, 5H), 2,87 (dd, $J = 16,5, 10,5$ Hz, 1H), 2,19 (dd, $J = 16,8, 4,6$ Hz, 1H), 1,70 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H), 1,38 - 1,23 (m, 3H), 1,12 (s, 10H), 1,10 (s, 8H).

(c) 11-Hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((trisiopropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (52)

Se añadió gota a gota dimetil sulfóxido (0,35 mL, 4,83 mmol, 2,5 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,2 mL, 2,32 mmol, 1,2 eq) en diclorometano seco (10 mL) a -78°C (baño de hielo seco/acetona) bajo una atmósfera de argón. Después de 10 minutos, una solución de **51** (1 g, 1,93 mmol) en diclorometano seco (8 mL) se añadió lentamente con la temperatura todavía a -78°C. Después de 15 minutos, se añadió gota a gota trietilamina (1,35 mL, secada sobre tamices moleculares de 4Å, 9,65 mmol, 5 eq) y se retiró el baño de hielo seco/acetona. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se extrajo con ácido clorhídrico frío (0,1 M), bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el diclorometano en exceso mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **52** (658 mg, 66%). LC/MS, 3,52 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 517,14 ([M + H]⁺, 100); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (s, 1H), 6,75 - 6,63 (m, *J* = 8,8, 4,0 Hz, 2H), 5,89 - 5,64 (m, *J* = 9,6, 4,1 Hz, 2H), 5,23 - 5,03 (m, 2H), 4,68 - 4,38 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,83 - 3,77 (m, 1H), 3,40 (s, 1H), 3,05 - 2,83 (m, 1H), 2,59 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H), 1,78 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H), 1,33 - 1,16 (m, 3H), 1,09 (d, *J* = 2,2 Hz, 9H), 1,07 (d, *J* = 2,1 Hz, 9H).

(d) 11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((trisiopropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (53)

Se añadió *terc*-butildimetilsililtriflato (0,70 mL, 3,00 mmol, 3 eq) a la solución del compuesto **52** (520 mg, 1,00 mmol) y 2,6-lutidina (0,46 mL, 4,00 mmol, 4 eq) en diclorometano seco (40 mL) a 0°C bajo argón. Después de 10 minutos, el baño frío se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente, 10% de acetato de etilo en hexano hasta 20% de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **53** (540 mg, 85%). LC/MS, 4,42 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 653,14 ([M + Na]⁺, 100); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (s, 1H), 6,71 - 6,64 (m, *J* = 5,5 Hz, 2H), 5,83 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,80 - 5,68 (m, *J* = 5,9 Hz, 1H), 5,14 - 5,06 (m, 2H), 4,58 (dd, *J* = 13,2, 5,2 Hz, 1H), 4,36 (dd, *J* = 13,3, 5,5 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,71 (td, *J* = 10,1, 3,8 Hz, 1H), 2,91 (dd, *J* = 16,9, 10,3 Hz, 1H), 2,36 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 1,75 (s, 3H), 1,31 - 1,16 (m, 3H), 1,12 - 1,01 (m, *J* = 7,4, 2,1 Hz, 18H), 0,89 - 0,81 (m, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,19 (s, 3H).

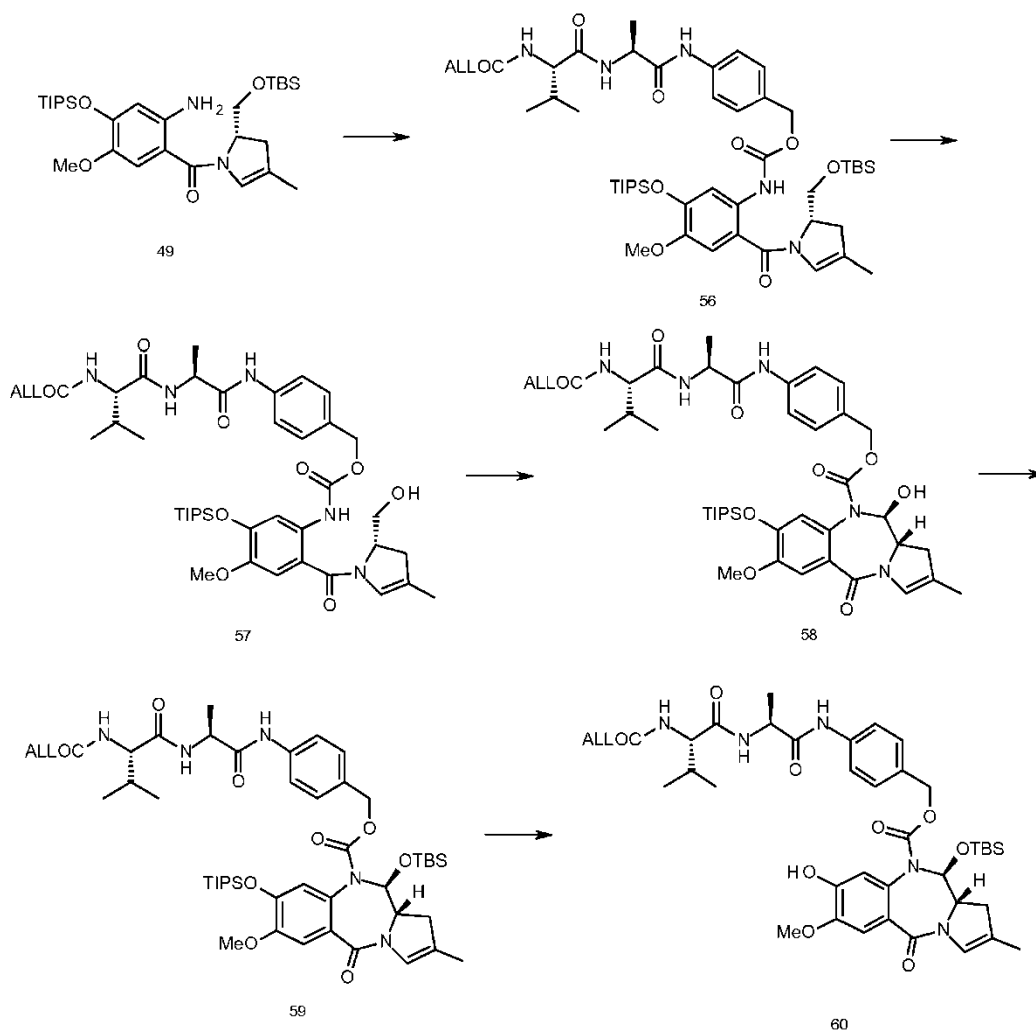
(e) 11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (54)

Se añadió acetato de litio (87 mg, 0,85 mmol) a una solución de compuesto **53** (540 mg, 0,85 mmol) en dimetilformamida húmeda (6 mL, 50:1 de DMF/agua). Después de 4 horas, la reacción se completó y la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (25 mL) y se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico (pH ~ 3), agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente, 25% a 75% de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **54** (400 mg, cuantitativo). LC/MS, (3,33 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 475,26 ([M+H]⁺, 100).

(f) 11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-8-((5-yodopentil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (55)

Diyodopentano (0,63 mL, 4,21 mmol, 5 eq) y carbonato de potasio (116 mg, 0,84 mmol, 1 eq) se añadieron a una solución de fenol **54** (400 mg, 0,84 mmol) en acetona (4 mL, secada sobre tamices moleculares). La mezcla de reacción se calentó luego a 60°C y se agitó durante 6 horas. La acetona se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 50/50, v/v, de hexano/acetato de etilo). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó para proporcionar **55** con un rendimiento del 90%. LC/MS, 3,90 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 670,91 ([M]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,23 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,87 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,83 - 5,68 (m, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,15 - 5,01 (m, 2H), 4,67 - 4,58 (m, 1H), 4,45 - 4,35 (m, 1H), 4,04 - 3,93 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,73 (td, *J* = 10,0, 3,8 Hz, 1H), 3,25 - 3,14 (m, *J* = 8,5, 7,0 Hz, 2H), 2,92 (dd, *J* = 16,8, 10,3 Hz, 1H), 2,38 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H), 1,95 - 1,81 (m, 4H), 1,77 (s, 3H), 1,64 - 1,49 (m, 2H), 0,88 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,23 (s, 3H).

(iii) 11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-(2-(1-(1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (70)



(a) 3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(((Terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)hidrazinil)propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alilo (**56**)

Se añadió trietilamina (2,23 mL, 18,04 mmol, 2,2 eq) a una solución agitada de la amina **49** (4 g, 8,20 mmol) y trifosgeno (778 mg, 2,95 mmol, 0,36 eq) en tetrahidrofurano seco (40 mL) a 5°C (baño de hielo). El progreso de la reacción de isocianato se vigiló eliminando periódicamente partes alícuotas de la mezcla de reacción y desactivando con metanol y realizando un análisis de LC/MS. Una vez que se completó la formación de isocianato, se añadió rápidamente una solución de alloc-Val-Ala-PABOH (4,12 g, 12,30 mmol, 1,5 eq) y trietilamina (1,52 mL, 12,30 mmol, 1,5 eq) en tetrahidrofurano seco (40 mL) mediante una inyección en el isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se siguió agitando a 40°C durante 4 horas. El exceso de disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente, metanol al 1% a metanol al 5% en diclorometano). (Unas condiciones de cromatografía alternativas que utilizan EtOAc y hexano también tuvieron éxito). Las fracciones puras se recogieron y combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **56** (3,9 g, 50%). LC/MS, 4,23 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 952,36 ($[M + H]^+$, 100); 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,62 (s a, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,77 (s a, 1H), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,57 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,17 (s, 1H), 6,03 - 5,83 (m, 1H), 5,26 (dd, $J = 33,8, 13,5$ Hz, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,70 - 4,60 (m, 2H), 4,58 (dd, $J = 5,7, 1,3$ Hz, 2H), 4,06 - 3,99 (m, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,82 - 3,71 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,79 - 2,64 (m, 1H), 2,54 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,16 (dc, $J = 13,5, 6,7$ Hz, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,35 - 1,24 (m, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,94 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,87 (s, 9H), 0,07 - -0,02 (m, 6H).

(b) 3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(Hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)hidrazinil)propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alilo (**57**)

El éter TBS **56** (1,32 g, 1,38 mmol) se disolvió en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (14:2:2:4 mL) y se siguió agitando a temperatura ambiente. Después de 3 horas, no se observó más material de partida por LC/MS. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (25 mL) y se lavó secuencialmente con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se

sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice, 2% de metanol en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **57** deseado (920 mg, 80%). LC/MS, 3,60 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 838,18 ([M+H]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,55 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,71 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,97 - 5,82 (m, *J* = 5,7 Hz, 1H), 5,41 - 5,15 (m, 3H), 5,10 (d, *J* = 3,5 Hz, 2H), 4,76 - 4,42 (m, 5H), 4,03 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 3,77 (s, 5H), 2,84 (dd, *J* = 16,7, 10,4 Hz, 1H), 2,26 - 2,08 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,44 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,30 (dt, *J* = 14,7, 7,4 Hz, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,96 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

(c) **11-Hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((trisiopropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (58)**

Se añadió gota a gota dimetil sulfóxido (0,2 mL, 2,75 mmol, 2,5 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,11 mL, 1,32 mmol, 1,2 eq) en diclorometano seco (7 mL) a -78°C (baño de hielo seco/acetona) bajo una atmósfera de argón. Después de 10 minutos, una solución de **57** (920 mg, 1,10 mmol) en diclorometano seco (5 mL) se añadió lentamente con la temperatura todavía a -78°C. Después de 15 minutos, se añadió gota a gota trietilamina (0,77 mL, se secó sobre tamices moleculares de 4 Å, 5,50 mmol, 5 eq) y se retiró el baño de hielo seco/acetona. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se extrajo con ácido clorhídrico frío (0,1 M), bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente de 2% de metanol a 5% de metanol en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y combinaron, y la eliminación del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto **58** (550 mg, 60%). LC/MS, 3,43 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 836,01 ([M]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 1H), 7,52 - 7,40 (m, 2H), 7,21 - 7,08 (m, *J* = 11,5 Hz, 2H), 6,67 (s, 1H), 6,60 - 6,47 (m, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,97 - 5,83 (m, 1H), 5,79 - 5,66 (m, 1H), 5,38 - 4,90 (m, 6H), 4,68 - 4,52 (m, *J* = 18,4, 5,5 Hz, 4H), 4,04 - 3,94 (m, *J* = 6,5 Hz, 1H), 3,87 - 3,76 (m, 5H), 3,00 - 2,88 (m, 1H), 2,66 - 2,49 (m, 2H), 2,21 - 2,08 (m, 2H), 1,76 (s, 3H), 1,45 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,09 - 0,98 (m, *J* = 8,9 Hz, 18H), 0,96 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,93 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H).

(d) **11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((trisiopropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (59)**

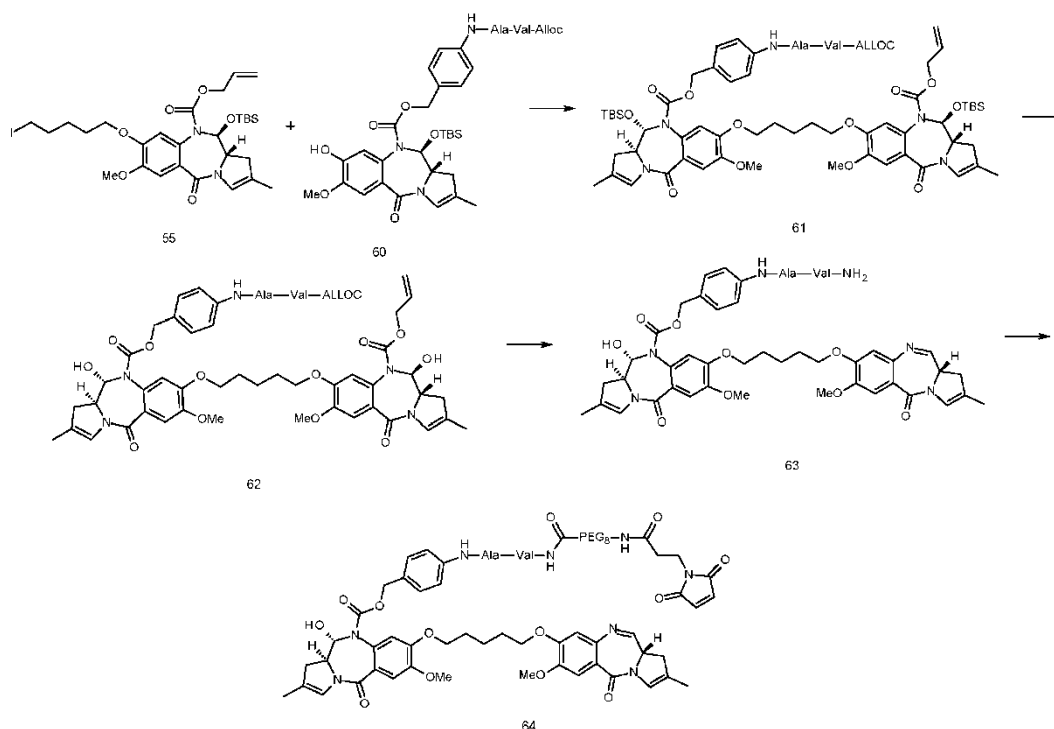
Se añadió *terc*-butildimetilsililtriflato (0,38 mL, 1,62 mmol, 3 eq) a la solución de compuesto **58** (450 mg, 0,54 mmol) y 2,6-lutidina (0,25 mL, 2,16 mmol, 4 eq) en diclorometano seco (5 mL) a 0°C bajo atmósfera de argón. Después de 10 minutos, el baño frío se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo con agua, bicarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 50/50 v/v de hexano/acetato de etilo). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **59** (334 mg, 65%). LC/MS, 4,18 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 950,50 ([M]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,53 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,72 - 6,61 (m, *J* = 8,9 Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97 - 5,79 (m, *J* = 24,4, 7,5 Hz, 2H), 5,41 - 5,08 (m, 5H), 4,86 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 4,69 - 4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,03 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, *J* = 9,6, 3,6 Hz, 1H), 2,43 - 2,09 (m, *J* = 34,8, 19,4, 11,7 Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,30 - 1,21 (m, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, *J* = 8,4 Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(e) **11-((Terc-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(Aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (60)**

Se añadió acetato de litio (50 mg, 0,49 mmol) a una solución de compuesto **59** (470 mg, 0,49 mmol) en dimetilformamida húmeda (4 mL, 50:1 de DMF/agua). Después de 4 horas, la reacción se completó y la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico (pH ~ 3), agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente de 50/50 a 25/75 v/v de hexano/acetato de etilo). Las fracciones puras se recogieron y combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **60** (400 mg, cuantitativo). LC/MS, 3,32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 794,18 ([M+H]⁺, 100). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,53 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,72 - 6,61 (m, *J* = 8,9 Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97 - 5,79 (m, *J* = 24,4, 7,5 Hz, 2H), 5,41 - 5,08 (m, 5H), 4,86 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 4,69 - 4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,03 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, *J* = 9,6, 3,6 Hz, 1H), 2,43 - 2,09 (m, *J* = 34,8, 19,4, 11,7 Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,30 - 1,21 (m, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, *J* = 8,4 Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) **11-Hidroxi-7-metoxi-8-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-**

il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encilo (**64**)



- 5 (a) 8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-(Aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encil)oxi)carbonil)-11-((tercbutildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-((tercbutildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-alilo (**61**)

10 Se añadió carbonato de potasio (70 mg, 0,504 mmol, 1 eq) a una solución de **55** (370 mg, 0,552 mmol, 1,2 eq) y fenol **60** (400 mg, 0,504 mmol) en acetona seca (25 mL). La reacción se agitó 8 horas a 70°C. La LC/MS mostraba que no se consumió todo el material de partida, por lo que la reacción se siguió agitando durante la noche a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales al día siguiente. La acetona se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 80% de acetato de etilo en hexano a 100% de acetato de etilo). Las fracciones puras se recogieron y combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto **61** (385 mg, 57%). LC/MS, 4,07 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1336,55 ([M+H]⁺, 50).

- 20 (b) 8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-(Aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-alilo (**62**)

25 Se añadió fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (1 M, 0,34 mL, 0,34 mmol, 2 eq) a una solución de **61** (230 mg, 0,172 mmol) en tetrahidrofurano seco (3 mL). El material de partida se consumió totalmente después de 10 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (30 mL) y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante **62** se usó como una mezcla cruda para la siguiente reacción. LC/MS, 2,87 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1108,11 ([M+H]⁺, 100).

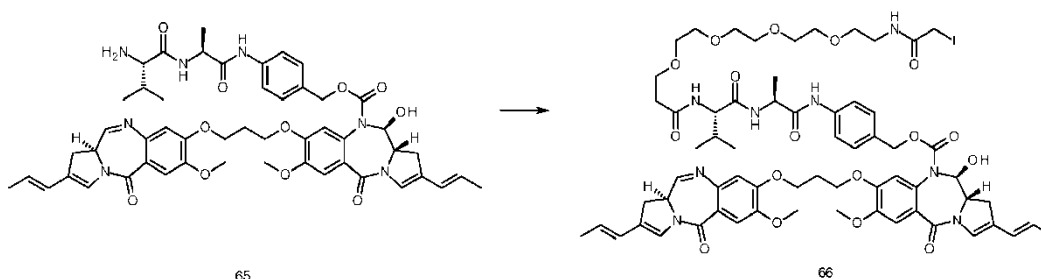
- 30 (c) 11-Hidroxi-7-metoxi-8-((5-((7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-4-(2-(1-((1-amino-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (**63**)

35 Se añadió *tetrakis*(trifenilfosfina)paladio(0) (12 mg, 0,01 mmol, 0,06 eq) a una solución de **62** crudo (0,172 mmol) y pirrolidina (36 μ L, 0,43 mmol, 2,5 eq) en diclorometano seco (10 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos y se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el exceso de diclorometano por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante **63** se usó como una mezcla cruda para la siguiente reacción. LC/MS, 2,38 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 922,16 ([M+H]⁺, 40).

(d) 11-Hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encilo (**64** o **DL5**)

- 5 Se añadió 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 33 mg, 0,172 mmol) a una solución de **63** crudo (0,172 mmol) y Mal-(PEG)₈-ácido (100 mg, 0,172 mmol) en diclorometano seco (10 mL). La reacción se agitó durante 2 horas y la presencia de material de partida ya no se observó más por LC/MS. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el exceso de diclorometano por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 100% de cloroformo a 10% de metanol en cloroformo). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar **64** o **DL5** (60 mg, 25% en 3 etapas).

I. Síntesis de Fármaco-Enlazador DL4 (Ruta 1)



- 15 El compuesto 65 es el compuesto 79 del documento WO 2011/130598

11-Hidroxi-7-metoxi-8-(3-((7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-4-(1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)encilo (**66** o **DL4**)

- 20 Se añadió *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC, 4,71 µL, 0,0304 mmol) a una solución de amina **65** (0,0276 mmol) y yodo-(PEG)₄-ácido (13,1 mg, 0,0304 mmol) en diclorometano seco (0,8 mL). La reacción se agitó durante 3 horas y la presencia de material de partida ya no se observó más por LC/MS. La mezcla de reacción se cargó directamente sobre una placa de cromatografía de capa fina (TLC) y se purificó por TLC preparativa (10% de metanol en cloroformo). Las bandas puras se rasparon de la placa de TLC, se recogieron 10% de metanol en cloroformo, se filtraron y se eliminó el exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar **66** (**D**) (20,9 mg, 56%). LC/MS, método 2, 3,08 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1361,16 ([M+H]⁺, 100).

J. Síntesis del Fármaco-Enlazador DL4 (Ruta 2)

Los siguientes métodos se emplearon en este Ejemplo J.

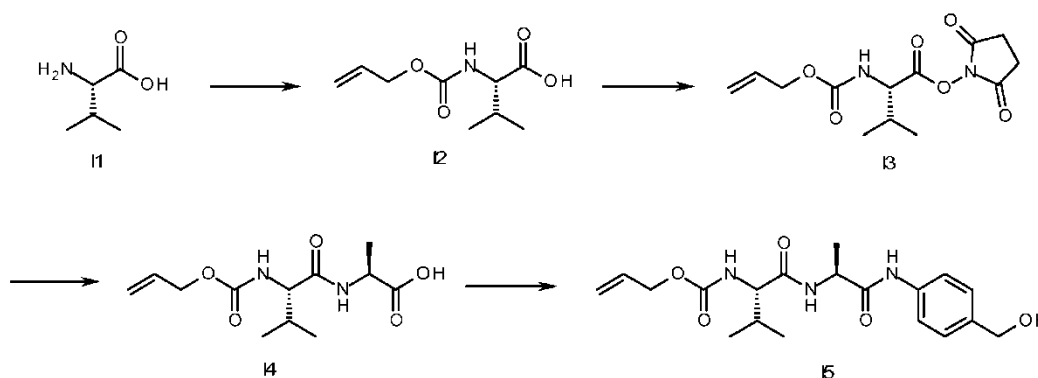
- 30 Los datos de LCMS se obtuvieron utilizando un aparato de LC/MS de Agilent serie 1200 con un cuadrupolo MS de Agilent 6110, con ionización por electropulverización. Fase móvil A - 0,1% de ácido acético en agua. Fase móvil B - 0,1% en acetonitrilo. Caudal de 1,00 ml/min. Gradiente de 5% de B que aumenta hasta 95% de B en 3 minutos, permaneciendo en 95% de B durante 1 minuto y luego retrocediendo a 5% de B durante 6 segundos. El tiempo total de ejecución es de 5 minutos. Columna: Phenomenex Gemini-NX 3 µm C18, 30 x 2,00 mm. Cromatogramas basados en una detección UV a 254 nm. Los espectros de masas se lograron utilizando MS en modo positivo. Los valores de desplazamiento químico en la RMN de protones se midieron en la escala delta a 400 MHz utilizando un aparato Bruker AV400. Se emplearon las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; m, multiplete; br, amplio. Las constantes de acoplamiento se indican en Hz. A menos que se indique lo contrario, la cromatografía en columna (mediante el procedimiento ultrarrápido) se realizó sobre gel de sílice de Merck (Art. 9385). Los datos de la espectroscopia de masas (MS) se recogieron utilizando un instrumento LCT Waters Micromass acoplado a un módulo de separaciones por HPLC 2795 de Waters. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas de aluminio y gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄). Todos los demás productos químicos y disolventes se adquirieron en Sigma-Aldrich o Fisher Scientific y se usaron tal como se suministraron sin una purificación adicional.

- 45 Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se proporcionan en g/100 mL. Los puntos de fusión se midieron utilizando un aparato digital de punto de fusión (Electrothermal). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro IR Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se indican en relación con TMS (δ = 0,0 ppm), y las señales se designan como s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (doble triplete), dd (doblete de dobletes), ddd (doble doblete de dobletes) o m (multiplete), con constantes de acoplamiento proporcionadas en hercios (Hz). Los datos de espec-

5 troscopia de masas (MS) se recogieron utilizando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a una HPLC de Waters 2695 con PDA Waters 2996. Los parámetros de Waters Micromass ZQ utilizados fueron: Capilaridad (kV), 3,38; Cono (V), 35; Extractor (V), 3,0; Temperatura de la fuente (°C), 100; Temperatura de desolvatación (°C), 200; Caudal de cono (L/h), 50; Caudal de desolvatación (L/h), 250. Los datos de la espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS) se recogieron en un aparato Waters Micromass QTOF Global en modo W positivo utilizando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó sobre placas de aluminio y gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y en la cromatografía ultrarrápida se utilizó gel de sílice (Merck 60, malla 230-400 ASTM). Excepto los reactivos para HOBt (NovaBiochem) y de soporte sólido (Argonaut), todos los demás productos químicos y disolventes se compraron en Sigma-Aldrich y se usaron tal como se suministran sin una purificación adicional. Los disolventes anhidros se prepararon mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seco en presencia de un agente de secado apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4Å o alambre de sodio. El éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60°C.

15 Condiciones generales de LC/MS: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó utilizando una fase móvil de agua (A) (0,1% de ácido fórmico) y acetonitrilo (B) (0,1% de ácido fórmico). Gradiente: composición inicial de 5% de B durante 1,0 min, luego 5% de B a 95% de B en 3 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min a 95% de B y luego se devolvió a 5% de B en 0,3 minutos. El tiempo total de ejecución del gradiente es igual a 5 min. El caudal de 3,0 mL/min, 400 µL se dividieron a través una pieza en T de volumen muerto cero que atraviesa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 exploraciones). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

20 Inicialmente se prepararon los siguientes productos intermedios.



(a-i) Ácido (S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (**12**)

25 Se añadió gota a gota cloroforniato de alilo (36,2 mL, 340,59 mmol, 1,2 eq) a una solución agitada de L-valina (**11**) (33,25 g, 283,82 mmol, 1,0 eq) y carbonato de potasio (59,27 g, 425,74 mmol, 1,5 eq) en agua (650 mL) y THF (650 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, luego el disolvente se concentró a presión reducida y la solución restante se extrajo con éter dietílico (3 x 100 mL). La porción acuosa se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con DCM (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto en forma de un aceite incoloro (57,1 g, rendimiento supuesto del 100%). LC/MS (1,966 min (ES⁺)), *m/z*: 202,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,57 (s a, 1H), 7,43 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 5,96 - 5,86 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,4, 1,7 Hz), 5,18 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,9, 1,6 Hz), 4,48 (dt, 2H, *J* = 5,3, 1,5 Hz), 3,85 (dd, 1H, *J* = 8,6, 6,0 Hz), 2,03 (oct, 1H, *J* = 6,6 Hz), 0,89 (d, 3H, *J* = 6,4 Hz), 0,87 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz).

(a-ii) 2-(Aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoato de (S)-2,5-dioxipirrolidin-1-ilo (**13**)

35 A una solución agitada del ácido protegido **12** (60,6 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) y N-hidroxisuccinimida (34,66 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) en THF seco (800 mL), se añadió dicitohexilcarbodiimida (62,14 g, 301,16 mmol, 1 eq). La reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró después, el sólido se lavó con THF y el material filtrado combinado se concentró a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en DCM y se dejó reposar a 0°C durante 30 minutos. La suspensión se filtró y se lavó con DCM frío. La concentración del material filtrado a presión reducida proporcionó el producto en forma de un aceite incoloro viscoso (84,7 g, rendimiento supuesto del 100%) que se usó en la siguiente etapa sin una purificación adicional. LC/MS (2,194 min (ES⁺)), *m/z*: 321,0 [M+Na]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,0 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz), 5,97 - 5,87 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,0, 1,7 Hz), 5,19 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,7, 1,4 Hz), 4,52 (dt, 2H, *J* = 5,3, 1,4 Hz), 4,32 (dd, 1H, *J* = 8,3, 6,6 Hz), 2,81 (m, 4H), 2,18 (oct, 1H, *J* = 6,7 Hz), 1,00 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz).

45 (a-iii) Ácido (S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanoico (**14**)

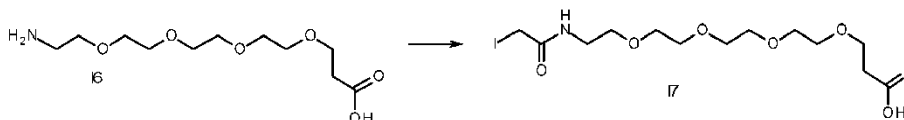
Una solución de éster de succinimida **13** (12,99 g, 43,55 mmol, 1,0 eq) en THF (50 mL) se añadió a una solución de

L-alanina (4,07 g, 45,73 mmol, 1,05 eq) y NaHCO₃ (4,02 g, 47,90 mmol, 1,1 eq) en THF (100 mL) y H₂O (100 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas y después el THF se eliminó a presión reducida. El pH se ajustó a 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma blanca. Después de la extracción con acetato de etilo (6 x 150 mL), los extractos orgánicos combinados se lavaron con H₂O (200 mL), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La trituración con éter dietílico proporcionó el producto en forma de un polvo blanco que se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico (5,78 g, 49%).

LC/MS (1,925 min (ES⁺)), *m/z*: 273,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,47 (s a, 1H), 8,17 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,16 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 5,95 - 5,85 (m, 1H), 5,29 (dd, 1H, *J* = 17,2, 1,7 Hz), 5,17 (dd, 1H, *J* = 10,4, 1,5 Hz), 4,46 (m, 2H), 4,18 (quin, 1H, *J* = 7,2 Hz), 3,87 (dd, 1H, *J* = 9,0, 7,1 Hz), 1,95 (oct, 1H, *J* = 6,8 Hz), 1,26 (d, 3H, *J* = 7,3 Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).

(a-iv) (S)-1-((S)-1-(4-(Hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-ilcarbamato de alilo (**15**)

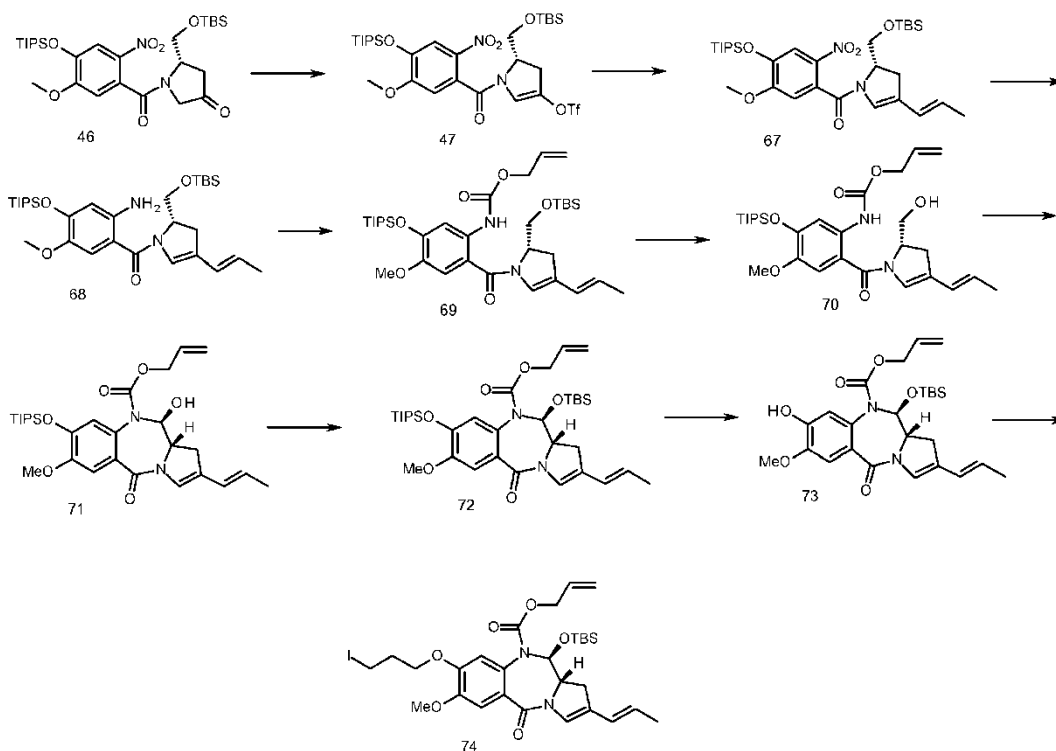
Se añadió EEDQ (5,51 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) a una solución de alcohol *p*-aminobencílico (2,74 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) y ácido **14** (5,78 g, 21,23 mmol, 1 eq) en THF seco (100 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La mezcla de reacción se concentró después a presión reducida y el sólido marrón resultante se trituró con éter dietílico y se filtró con un lavado posterior con un exceso de éter dietílico para proporcionar el producto en forma de un sólido blanquecino (7,1 g, 88%). LC/MS (1,980 min (ES⁺)), *m/z*: 378,0 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,89 (s a, 1H), 8,13 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz), 7,52 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,26 (m, 1H), 7,23 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,91 (m, 1H), 5,30 (m, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,46 (m, 2H), 5,09 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz), 4,48 (m, 2H), 4,42 (m, 3H), 3,89 (dd, 1H, *J* = 8,6, 6,8 Hz), 1,97 (m, 1H), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz).



Ácido 1-yodo-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaoctadecan-18-oico (**17**)

Se añadió una solución de anhídrido yodoacético (0,250 g, 0,706 mmol, 1,1 eq) en DCM seco (1 mL) a amino-PEG₍₄₎-ácido **16** (0,170 g, 0,642 mmol, 1,0 eq) en DCM (1 mL). La mezcla se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0,1 M, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 3% de MeOH y 0,1% de ácido fórmico en cloroformo a 10% de MeOH y 0,1% de ácido fórmico en cloroformo) para proporcionar el producto en forma de un aceite naranja (0,118 g, 42%). LC/MS (1,623 min (ES⁺)), *m/z*: 433,98 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,069 (s, 1H), 7,22 (s a, 1H), 3,79 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz), 3,74 (s, 2H), 3,72 - 3,58 (m, 14H), 3,50 - 3,46 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz).

(ii) 11-(Terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo (**74**)



(a) Trifluorometanosulfonato de (S)-5-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-(triisopropilsililoxi)benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-ilo (**47**)

Se añadió gota a gota anhídrido triflico (28,4 g, 100,0 mmol, 3,0 eq), durante 25 minutos, a una solución agitada a fondo de la cetona **46** (19,5 g, 30,0 mmol, 1,0 eq) en DCM (550 mL) que contenía 2,6-lutidina (14,4 g, 130,0 mmol, 4,0 eq) a -50°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas hasta que la LC/MS indicó que se había completado la reacción. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (100 mL), bicarbonato de sodio saturado (150 mL), salmuera (50 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 90/10 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (19,5 g, 82%). LC/MS (4,391 min (ES⁺)), *m/z*: 713,25 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,02 (t, 1H, *J* = 1,9 Hz), 4,75 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,15 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 10,3, 2,3 Hz), 2,96 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 4,0, 1,6 Hz), 1,28 - 1,21 (m, 3H), 1,07 (d, 18H, *J* = 7,2 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H).

(b) (S,E)-(2-((Terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-(triisopropilsililoxi)fenil)metanona (**67**)

Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,41 g, 0,35 mmol, 0,03 eq) a una mezcla del triflato **47** (8,4 g, 11,8 mmol, 1,0 eq), ácido *E*-1-propen-1-ilborónico (1,42 g, 16,5 mmol, 1,4 eq) y fosfato de potasio (5,0 g, 23,6 mmol, 2,0 eq) en dioxano seco (60 mL) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 25°C durante 120 minutos hasta que la LC/MS indicó que se había completado la reacción. Se añadieron acetato de etilo (120 mL) y agua (120 mL), la fase orgánica se eliminó, se lavó con salmuera (20 mL) y se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 95/5 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto en forma de una espuma amarilla (4,96 g, 70%). LC/MS (4,477 min (ES⁺)), *m/z*: 605,0 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 5,93 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,67 (s, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,85 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 1,72 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,0 Hz), 1,30 - 1,22 (m, 3H), 1,07 (d, 18H, *J* = 7,2 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

(c) 2-((Terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona de (SE)-(2-amino-5-metoxi-4-(triisopropilsililoxi)fenilo) (**68**)

Se añadió polvo de zinc (22,0 g, 0,33 mol, 37 eq), en porciones durante 20 minutos, a una solución del producto intermedio de propenilo **67** (5,5 g, 9,1 mmol, 1,0 eq) en 5% v/v de ácido fórmico/etanol (55 mL), utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura entre 25-30°C. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de celite®. El celite® se lavó con acetato de etilo (65 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con agua (35 mL), bicarbonato de sodio saturado (35 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 90/10 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (3,6 g, 69,0%). LC/MS (4,439 min (ES⁺)), *m/z*: 575,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,75

(m, 1H), 6,40 (s a, 1H), 6,28 (m, 1H), 6,11 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz), 5,53 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 3,93 (s a, 1H), 3,84 (s a, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,86 (dd, 1H, $J = 15,7, 10,4$ Hz), 2,73 (dd, 1H, $J = 15,9, 4,5$ Hz), 1,80 (dd, 3H, $J = 6,8, 1,3$ Hz), 1,35 - 1,23 (m, 3H), 1,12 (d, 18H, $J = 7,3$ Hz), 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

(d) **2-(2-((Terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(triisopropilsililoxi)fenilcarbamato de (S,E)-alilo (69)**

Se añadió cloroformiato de alilo (0,83 g, 6,88 mmol, 1,1 eq) a una solución de la amina **68** (3,6 g, 6,26 mmol, 1,0 eq) en DCM seco (80 mL) que contenía piridina seca (1,09 g, 13,77 mmol, 2,2 eq) a -78°C . Se retiró el hielo seco y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de agitar durante otros 15 minutos, la LC/MS indicó que se había completado la reacción. La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 0,01 N (50 mL), bicarbonato de sodio saturado (50 mL) y salmuera (10 mL), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin una purificación adicional (4,12 g, rendimiento supuesto del 100%). LC/MS (4,862 min (ES⁺)), m/z : 659,2 [M+H]⁺.

(e) **2-(2-(Hidroximetil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(triisopropilsililoxi)fenilcarbamato de (S,E)-alilo (70)**

El producto intermedio **69** crudo (se asumió un rendimiento del 100%, 4,12 g, 6,25 mmol, 1,0 eq) se disolvió en una mezcla de ácido acético (70 mL), metanol (10 mL), THF (10 mL) y agua (20 mL) y se siguió agitando a temperatura ambiente. Después de 6 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (500 mL) y se lavó sucesivamente con agua (2 x 500 mL), bicarbonato de sodio saturado (300 mL) y salmuera (50 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1/99 v/v de metanol/DCM a 5/95 v/v de metanol/DCM) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo y se recuperó 1 g más de material de partida sin reaccionar. Este material se sometió a las mismas condiciones de reacción que anteriormente, pero se siguió agitando durante 16 h. Después del tratamiento y la purificación, se aisló un producto adicional (2,7 g, 79%, 2 etapas) LC/MS (3,742 min (ES⁺)), m/z : 545,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,38 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,10 (d, 1H, $J = 15,8$ Hz), 5,97 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,36 (ddd, 1H, $J = 17,2, 3,1, 1,5$ Hz), 5,25 (ddd, 1H, $J = 10,4, 2,5, 1,3$ Hz), 4,78 (m, 1H), 4,65 (dt, 2H, $J = 5,7, 1,3$ Hz), 3,84 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,04 (dd, 1H, $J = 16,7, 10,5$ Hz), 2,40 (dd, 1H, $J = 16,0, 4,5$ Hz), 1,82 (dd, 3H, $J = 6,8, 1,0$ Hz), 1,36 - 1,26 (m, 3H), 1,14 (d, 18H, $J = 7,3$ Hz).

(f) **11-Hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (71)**

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (1,16 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,94 g, 7,43 mmol, 1,5 eq) en DCM (25 mL) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78°C , después de 10 minutos, una solución del alcohol primario **70** (2,7 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) en DCM (20 mL), se añadió gota a gota. Después de otros 15 minutos, se añadió trietilamina seca (2,5 g, 24,78 mmol, 5,0 eq) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío (50 mL), hidrogenocarbonato de sodio saturado (50 mL) y salmuera (10 mL) y la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo que se usó en la siguiente etapa sin una purificación adicional (2,68 g, rendimiento supuesto del 100%). LC/MS (3,548 min (ES⁺)), m/z : 543,2 [M+H]⁺.

(g) **11-(Terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (72)**

Se añadió sulfonato de *terc*-butildimetilsililtrifluorometano (3,93 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) a una solución de la carbino-lamina **71** (rendimiento supuesto del 100% 2,68 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) y 2,6-lutidina (2,12 g, 19,83 mmol, 4,0 eq) en DCM seco (40 mL) a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos más. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (10 mL), bicarbonato de sodio saturado (10 mL) y salmuera (5 mL), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo a 2/98 v/v de metanol/cloroformo) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo (2,0 g, 63%, 2 etapas). LC/MS (4,748 min (ES⁺)), m/z : 657,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,19 (s, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,22 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz), 5,81 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 5,78 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,11 (d, 1H, $J = 50$ Hz), 5,08 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H, $J = 13,4, 5,4$ Hz), 4,35 (dd, 1H, $J = 13,2, 5,7$ Hz), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 1H), 3,00 (dd, 1H, $J = 15,6, 11,0$ Hz), 2,53 (m, 1H), 1,81 (dd, 3H, $J = 6,8, 0,9$ Hz), 1,30 - 1,18 (m, 3H), 1,08 (d, 9H, $J = 2,3$ Hz), 1,06 (d, 9H, $J = 2,3$ Hz), 0,86 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

(h) **11-(Terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (73)**

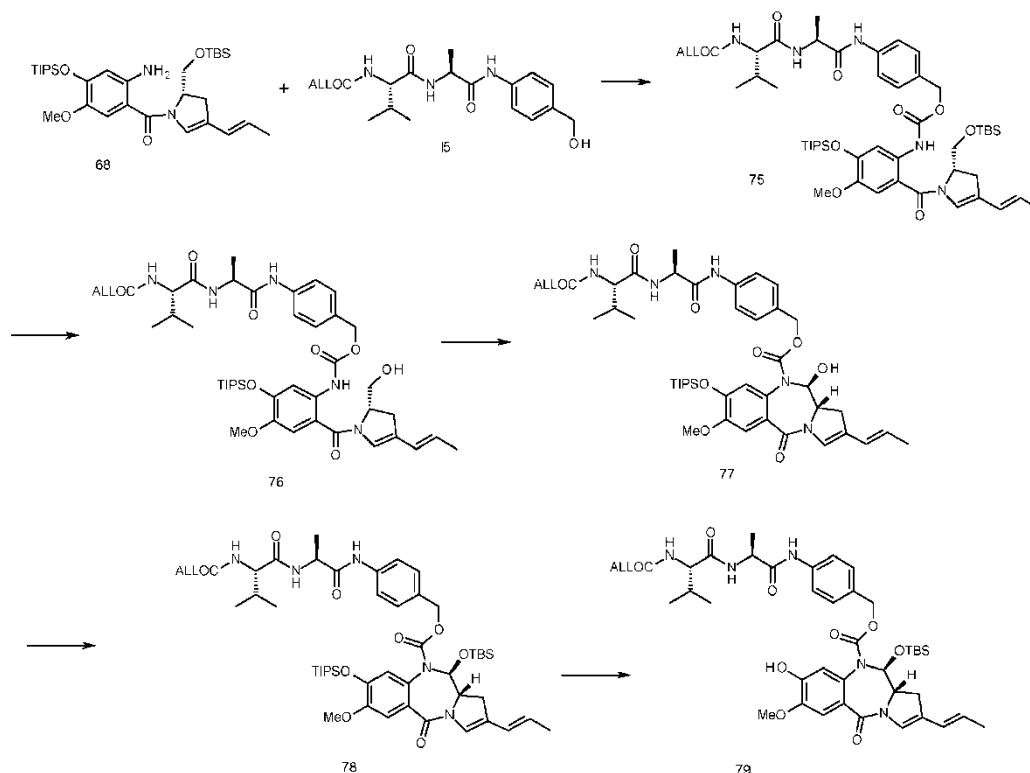
Se añadió acetato de litio dihidrato (0,31 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) a una solución de diazepina **72** (2,0 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) en DMF húmeda (20 mL) a 25°C y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 mL) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (50 mL, pH 3), agua (50 mL) y salmuera (10 mL), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida

(gel de sílice, 50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc a 25/75 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto como un sólido amarillo pálido (0,68 g, 45%). LC/MS (3,352 min (ES⁺)), *m/z*: 501,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,02 (s, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,03 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 5,80 (s, 1H), 5,63 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,55 (m, 1H), 5,29 (m, 1H), 4,87 (m, 2H), 4,39 (dd, 1H, *J* = 13,5, 4,2 Hz), 4,20 (dd, 1H, *J* = 13,2, 5,7 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 2,81 (dd, 1H, *J* = 16,1, 10,5 Hz), 2,35 (d, 1H, *J* = 15,7 Hz), 1,61 (d, 3H, *J* = 6,4 Hz), 0,67 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

(i) **11-(Terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11*aS*)-alilo (**74**)**

Diyodopropano (0,295 g, 1,00 mmol, 5,0 eq) y carbonato de potasio (0,028 g, 0,20 mmol, 1,0 eq) se añadieron a una solución del fenol **33** (0,100 g, 0,020 mmol, 1,0 eq) en acetona seca (5 mL). La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 6 horas hasta que la LC/MS indicó que se había completado la reacción. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 75/25 v/v de *n*-hexano/EtOAc a 50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto en forma de un aceite incoloro (0,074 g, 56%). LC/MS (3,853 min (ES⁺)), *m/z*: 669,0 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,3 Hz), 5,87 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,78 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,12 (m, 2H), 4,65 (m, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,40 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz), 3,05 (dd, 1H, *J* = 16,3, 10,1 Hz), 2,57 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,84 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 0,92 (s, 9H), 0,28 (s, 3H), 0,26 (s, 3H).

(iii) **11-(Terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11*aS*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (**79**)**



(a) **((*S*)-1-(((*S*)-1-(4-(((*S*)-2-((Terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-((*E*)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triosopilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**75**)**

Se añadió trietilamina (0,256 mL, 1,84 mmol, 2,2 eq) a una solución agitada de la amina **68** (0,480 g, 0,835 mmol, 1,0 eq) y trifosgeno (0,089 g, 0,301 mmol, 0,36 eq) en THF seco (15 mL) a 5°C (baño de hielo). El progreso de la reacción de isocianato se vigiló retirando periódicamente partes alícuotas de la mezcla de reacción y desactivando con metanol y realizando un análisis LCMS. Una vez que se completó la reacción de isocianato, una solución de Alloc-Val-Ala-PABOH **15** (0,473 g, 1,25 mmol, 1,5 eq) y trietilamina (0,174 mL, 1,25 mmol, 1,5 eq) en THF seco (10 mL) se añadió rápidamente mediante inyección en el isocianato recién preparado. La reacción se siguió agitando a 40°C durante 4 horas, seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 20/80 v/v de *n*-hexano/EtOAc a 50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc, luego 1/99 v/v de DCM/MeOH a 5/95 v/v de DCM/MeOH) para proporcionar el producto como un sólido amarillo (0,579 g, 71%). LC/MS (4,468 min (ES⁺)), *m/z*: 978,55 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 7,31 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,59 (d,

1H, $J = 7,6$ Hz), 6,36 (s a, 1H), 6,04 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz), 5,90 (m, 1H), 5,55 (m, 1H), 5,33 - 5,21 (m, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,66 (m, 2H), 4,57 (dd, 2H, $J = 5,6, 1,0$ Hz), 3,98 (dd, 1H, $J = 7,3, 6,8$ Hz), 3,90 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,82 (dd, 1H, $J = 15,4, 9,6$ Hz), 2,72 (dd, 1H, $J = 15,9, 3,5$ Hz), 2,17 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, $J = 6,5, 0,8$ Hz), 1,46 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, $J = 7,1$ Hz), 0,97 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,83 (s, 9H), 0,04 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-(Hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**76**)

El éter silílico **75** (1,49 g, 1,52 mmol, 1,0 eq) se disolvió en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (14:2:2:4 mL) y se siguió agitando a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la reacción se diluyó con EtOAc (100 mL), se lavó secuencialmente con agua, bicarbonato de sodio ac. y luego salmuera. La fase orgánica se secó luego sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 100/0 luego 99/1 a 92/8 v/v de DCM/MeOH) para proporcionar el producto en forma de un sólido naranja (1,2 g, 92%). LC/MS (3,649 min (ES⁺)), m/z : 865,44 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,69 (s a, 1H), 7,53 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,32 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 6,78 (s, 1H), 6,56 (m, 2H), 6,32 (s a, 1H), 6,05 (d, 1H, $J = 14,9$ Hz), 5,90 (m, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,30 (m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,10 (d, 2H, $J = 3,1$ Hz), 4,73 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,57 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 4,01 (m, 1H), 3,79 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,98 (dd, 1H, $J = 16,3, 10,2$ Hz), 2,38 (dd, 1H, $J = 16,6, 4,1$ Hz), 2,16 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, $J = 6,8, 0,9$ Hz), 1,46 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, $J = 7,4$ Hz), 0,97 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz), 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz).

(c) 11-Hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triospropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**77**)

Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (0,180 g, 2,3 mmol, 3,0 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,147 g, 1,1 mmol, 1,5 eq) en DCM (10 mL) a -78°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78°C, después de 20 minutos, se añadió gota a gota una solución del alcohol primario **76** (0,666 g, 0,77 mmol, 1,0 eq) en DCM (10 mL). Después de 15 minutos más, se añadió trietilamina seca (0,390 g, 3,85 mmol, 5,0 eq) y la mezcla de reacción se dejó calentando hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío (10 mL), hidrogenocarbonato de sodio saturado (10 mL) y salmuera (5 mL). La capa orgánica se secó luego sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó luego mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc a 25/75 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto como un sólido blanco (0,356 g, 54%). LC/MS (3,487 min (ES⁺)), m/z : 862,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,34 (s a, 1H), 7,47 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,17 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 6,86 (s a, 1H), 6,65 (s a, 1H), 6,42 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 6,22 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 5,80 (m, 1H), 5,40 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,21 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz), 5,06 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz), 4,90 (m, 1H), 4,58 (m, 3H), 3,98 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,05 (dd, 1H, $J = 16,0, 10,3$ Hz), 2,76 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,80 (dd, 3H, $J = 6,7, 0,8$ Hz), 1,44 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,16 (m, 3H), 1,01 (d, 18H, $J = 6,6$ Hz), 0,96 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz).

(d) 11-(Terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triospropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**78**)

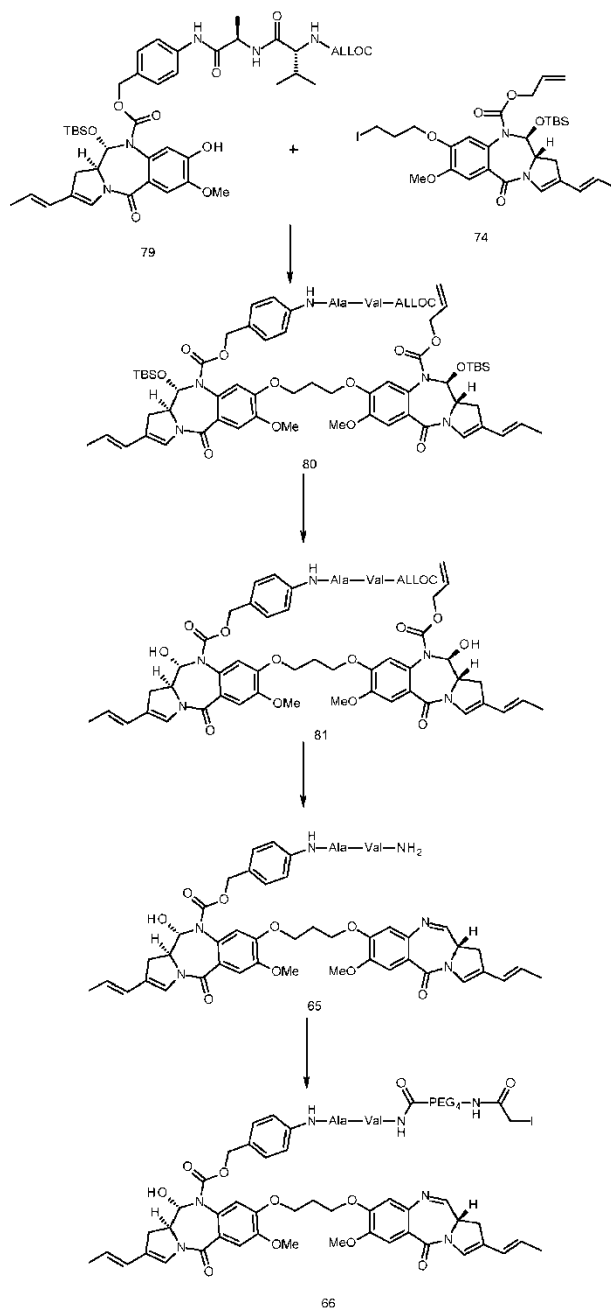
Se añadió sulfonato de *terc*-butildimetilsililtrifluorometano (0,46 g, 1,74 mmol, 3,0 eq) a una solución de alcohol secundario **77** (0,5 g, 0,58 mmol, 1,0 eq) y 2,6-lutidina (0,25 g, 2,32 mmol, 4,0 eq) en DCM seco (10 mL) a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 120 minutos más. La fase orgánica se lavó después sucesivamente con agua (10 mL), bicarbonato de sodio saturado (10 mL) y salmuera (5 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto como un sólido blanco (0,320 g, 57%). LC/MS (4,415 min (ES⁺)), m/z : 976,52 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (s a, 1H), 7,48 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 6,89 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,38 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz), 6,25 (d, 1H, $J = 14,6$ Hz), 5,93 (m, 1H), 5,85 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,24 (m, 2H), 5,15 (d, 1H, $J = 12,5$ Hz), 4,86 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz), 4,62 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,78 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, $J = 6,6, 0,7$ Hz), 1,48 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 1,20 (m, 3H), 1,05 (d, 9H, $J = 2,9$ Hz), 1,03 (d, 9H, $J = 2,9$ Hz), 0,99 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,95 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,88 (s, 9H), 0,27 (s, 3H), 0,14 (s, 3H).

(e) 11-(Terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**79**)

Se añadió acetato de litio dihidratado (0,010 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) a una solución del éter silílico **78** (0,100 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) en DMF húmeda (2 mL) a 25°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó luego con acetato de etilo (20 mL) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (20 mL, pH 3), agua (20 mL) y salmuera (5 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultra-

rápida (gel de sílice, 5/95 v/v de metanol/DCM) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (0,070 g, 83%). LC/MS (3,362 min (ES⁺)), *m/z*: 820,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 1H), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,25 (s, 1H), 7,12 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 6,88 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,47 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,2 Hz), 6,03 (s, 1H), 5,92 (m, 1H), 5,84 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,26 (m, 2H), 5,18 (d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 4,80 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz), 4,66 - 4,60 (m, 3H), 4,02 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,8 Hz), 1,48 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,00 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,26 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-Hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxa-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)bencilo (**66** o **DL4**)



(a) 8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(Aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benciloxi)carbonil)-11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**80**)

Se añadió carbonato de potasio (0,030 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) a una solución del fenol **79** (0,175 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) y el enlazador de yodo **74** (0,214 g, 0,32 mmol, 1,5 eq) en acetona (10 mL). La mezcla de reacción se calentó bajo una atmósfera de nitrógeno a 75°C en un matraz sellado durante 17 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 2/98 v/v de metanol/DCM a 5/95 v/v de metanol/DCM) para proporcionar el producto en forma de un sólido amarillo pálido (0,100 g, 35%). LC/MS (4,293 min (ES⁺)), *m/z*: 1359,13 [M]⁺.

(b) 8-(3-((11S,11aS)-10-(((R)-2-((R)-2-(Aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benciloxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (**81**)

Se añadió fluoruro de tetra-n-butilamonio (1 M, 0,22 mL, 0,22 mmol, 2,0 eq) a una solución de éter silílico **80** (0,150 g, 0,11 mmol, 1,0 eq) en THF seco (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, después de lo cual, la LC/MS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (10 mL) y se lavó secuencialmente con agua (5 mL) y salmuera (5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un sólido amarillo. Una purificación mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6/94 v/v de metanol/DCM a 10/90 v/v de metanol/DCM) produjo el producto en forma de un sólido amarillo pálido (0,090 g, 73%). LC/MS (2,947 min (ES⁺)), *m/z*: 1154,0 [M+Na]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s a, 1H), 7,39 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz), 7,18 (d, 2H, *J* = 10,6 Hz), 7,10 (m, 3H), 6,86 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 6,74 (s, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,22 (dd, 2H, *J* = 15,3, 6,6 Hz), 5,85 (m, 2H), 5,74 (m, 3H), 5,52 (m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,00 (m, 2H), 4,57 (m, 6H), 4,41 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 3,85 (m, 11H), 3,06 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,79 (d, 6H, *J* = 6,4 Hz), 1,40 (d, 3H, *J* = 6,1 Hz), 0,90 (m, 6H).

(c) 11-Hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((R)-2-((R)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**65**)

Se añadió tetrakis(trifenilfosfeno)paladio(0) (0,005 g, 0,005 mmol, 0,06 eq) a una solución de la bis-carbinolamina **81** (0,090 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) y pirrolidina (16 µL, 0,20 mmol, 2,5 eq) en DCM seco (5 mL). Después de 20 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 mL) y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio saturado (5 mL) y salmuera (5 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida para dejar el producto crudo en forma de un sólido amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin una purificación adicional (0,075 g, rendimiento supuesto del 100%). LC/MS (2,060 min (ES⁺)), *m/z*: 947,2 [M+H]⁺.

(d) 11-Hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)bencilo (**66** o **DL4**)

Se añadió EDCI (0,015 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) a una solución de amina **65** (se supone 100% de rendimiento 0,075 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) y yodoacetamida-PEG₄-ácido **17** (0,034 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) en diclorometano seco (5 mL) y la reacción se agitó en la oscuridad. Después de 50 minutos, se añadió una cantidad adicional de yodoacetamida-PEG₄-ácido **17** (0,007 g, 0,016 mmol, 0,2 eq) junto con una cantidad adicional de EDCI (0,003 g, 0,016 mmol, 0,2 eq). Después de un total de 2,5 horas, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (15 mL) y se lavó secuencialmente con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo 100% hasta 90:10 v/v de cloroformo:metanol). Las fracciones puras se combinaron para proporcionar el producto (0,0254 g, 23%, 2 etapas). Las fracciones crudas se recogieron y se purificaron mediante TLC preparativa (gel de sílice, 90:10 v/v de cloroformo:metanol) para proporcionar un segundo lote de producto (0,0036 g, 3%, 2 etapas). LC/MS (2,689 min (ES⁺)), *m/z*: 681,0 1/2 [M+2H]⁺.

Se apreciará que los compuestos sintetizados en este Ejemplo 1 se pueden conjugar con anticuerpos anti-DLL3 tal y como se describe en el presente documento para proporcionar los ADCs 1 - 5 descritos.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos anti-DLL3

Los anticuerpos murinos anti-DLL3 se produjeron de la siguiente manera. En una primera campaña de inmunización, tres ratones (cada uno procedente de las siguientes cepas: Balb/c, CD-1, FVB) se inocularon con proteína DLL3-humana (hDLL3-Fc) emulsionada con un volumen igual de TiterMax® o adyuvante de alumbre. La estructura artificial de fusión hDLL3-Fc se adquirió en Adipogen International (número de catálogo AG-40A-0113). Se realizó una inmunización inicial con una emulsión de 10 µg de hDLL3-Fc por ratón en TiterMax. Los ratones se reforzaron después cada dos semanas con 5 µg de hDLL3-Fc por ratón en adyuvante de alumbre. La inyección final antes de la fusión era de 5 µg de hDLL3-Fc por ratón en PBS.

En una segunda campaña de inmunización, se inocularon seis ratones (dos de cada una de las siguientes cepas:

Balb/c, CD-1, FVB) con la proteína DLL3-His humana (hDLL3-His), emulsionada con un volumen igual de TiterMax® o adyuvante de alumbre. La proteína hDLL3-His recombinante se purificó a partir del material sobrenadante de las células CHO-S modificadas genéticamente para sobreexpresar hDLL3-His. La inmunización inicial era con una emulsión de 10 µg de hDLL3-His por ratón en TiterMax. Los ratones se reforzaron después cada dos semanas con 5 µg de hDLL3-His por ratón en adyuvante de alumbre. La inyección final era con 2×10^5 células HEK-293T modificadas genéticamente para sobreexpresar hDLL3.

Los ensayos ELISA en fase sólida se utilizaron para escrutar sueros de ratón en busca de anticuerpos IgG de ratón específicos de DLL3 humano. Una señal positiva superior al ruido de fondo era indicativa de anticuerpos específicos de DLL3. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos (VWR International, nº de cat. 610744) con DLL3-His recombinante a 0,5 µg/ml en tampón de recubrimiento para ELISA, durante la noche. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,02% (v/v), los pocillos se bloquearon con BSA al 3% (p/v) en PBS, 200 µL/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). El suero de ratón se tituló (1:100, 1:200, 1:400 y 1:800) y se añadió a las placas recubiertas con DLL3 a 50 µL/pocillo y se incubó a RT durante 1 hora. Las placas se lavan y luego se incuban con 50 µL/pocillo de IgG anti-ratón de cabra marcada con HRP diluida 1:10.000 en BSA-PBS al 3% o FCS al 2% en PBS, durante 1 hora a RT. Nuevamente, las placas se lavaron y se añadieron 40 µL/pocillo de una solución de sustrato TMB (Thermo Scientific 34028) durante 15 minutos a RT. Después del desarrollo, un volumen igual de H_2SO_4 2 N se añadió para detener el desarrollo del sustrato y las placas se analizaron con un espectrofotómetro a una DO 450.

Los ratones inmunizados con sueros positivos se sacrificaron y los ganglios linfáticos de drenaje (poplíteos, inguinales e ilíacos mediales) se diseccionaron y se utilizaron como fuente para células productoras de anticuerpos. Suspensiones celulares de linfocitos B (aproximadamente 229×10^6 células procedentes de los ratones inmunizados con hDLL3-Fc, y 510×10^6 células procedentes de los ratones inmunizados con hDLL3-His) se fusionaron con células de mieloma P3x63Ag8.653 no secretoras en una proporción de 1:1 mediante fusión eléctrica de células, utilizando un sistema Hybrimmune de BTX (BTX Harvard Apparatus). Las células se resuspendieron en medio de selección de hibridoma que consistía en medio DMEM complementado con azaserina, 15% de suero de clon fetal I, 10% de BM Condimed (Roche Applied Sciences), aminoácidos no esenciales 1 mM, HEPES 1 mM, 100 UI de penicilina-estreptomicina y 2-mercaptoetanol 50 µM, y se cultivaron en cuatro matraces T225 en 100 ml de medio de selección por matraz. Los matraces se colocaron en una incubadora humidificada a 37°C que contenía 5% de CO_2 y un 95% de aire durante seis a siete días.

El día seis o siete después de las fusiones, se recogieron las células de la genoteca de hibridomas de los matraces y se extendieron en placas con una célula por pocillo (usando el clasificador de células FACSAria I) en 200 µl de medio de selección de hibridoma complementado (como se ha descrito anteriormente) en 64 placas Falcon de 96 pocillos y 48 placas de 96 pocillos para la campaña de inmunización con hDLL3-His. El resto de la genoteca se almacenó en nitrógeno líquido.

Los hibridomas se cultivaron durante 10 días y el material sobrenadante se escrutó en busca de anticuerpos específicos de hDLL3 usando citometría de flujo, como se describe a continuación. Se incubaron 1×10^5 células HEK-293T modificadas genéticamente por pocillo para sobreexpresar DLL3 humano, DLL3 de ratón (teñido previamente con colorante) o DLL3 de macaco cangrejero (teñido previamente con Dylight800) durante 30 minutos con 25 µL de material sobrenadante de hibridoma. Las células se lavaron con PBS/2% de FCS y luego se incubaron con 25 µl por muestra de IgG de cabra anti-ratón marcada con DyeLight 649, fragmento Fc específico secundario diluido 1:300 en PBS/2% de FCS. Después de una incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS/FCS al 2% y se resuspendieron en PBS/FCS al 2% con DAPI y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la fluorescencia que excedía a la de las células teñidas con un anticuerpo de control del isotipo. Las células de la genoteca de hibridomas restantes no utilizadas se congelaron en nitrógeno líquido para futuras pruebas y escrutinios.

La campaña de inmunización con hDLL3-His produjo aproximadamente 50 anticuerpos murinos anti-hDLL3 y la campaña de inmunización con hDLL3-Fc produjo aproximadamente 90 anticuerpos murinos anti-hDLL3.

Ejemplo 3

Secuenciación de anticuerpos anti-DLL3

Basándose en lo anterior, se seleccionaron varios anticuerpos monoclonales de distintos ejemplares que se unían a células DLL3 o h293-hDLL3 humanas inmovilizadas con una afinidad aparentemente alta, para la secuenciación y el análisis adicional. Como se muestra en forma tabular en las FIGS. 3A y 3B, el análisis de la secuencia de las regiones variables de la cadena ligera (FIG. 3A) y las regiones variables de la cadena pesada (FIG. 3B) de los anticuerpos monoclonales seleccionados, generados en el Ejemplo 2 confirmaba que muchos tenían regiones determinantes de complementariedad novedosas y, a menudo, mostraban nuevas disposiciones VDJ. Téngase en cuenta que las regiones determinantes de complementariedad y las regiones estructurales establecidas en las FIGS. 3A y 3B se definen según Kabat et al. (supra) utilizando una versión del propietario de la base de datos Abysis.

Las células de hibridoma seleccionadas inicialmente que expresaban los anticuerpos deseados, se lisaron en el reactivo Trizol® (Sistema de purificación de ARN Trizol® Plus, Life Technologies) para preparar el ARN que codificaba los anticuerpos. Entre 10^4 y 10^5 células se resuspendieron en 1 ml de Trizol y se agitaron vigorosamente des-

pués de la adición de 200 µl de cloroformo. Las muestras se centrifugaron después a 4°C durante 10 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo y se añadió un volumen igual de etanol al 70%. La muestra se cargó en una columna de centrifugado RNeasy Mini, se colocó en un tubo de recogida de 2 mL y se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se extrajo por elución, directamente a la membrana de la columna de centrifugado con 100 µL de agua exenta de ARNasa. La calidad de las preparaciones de ARN se determinó mediante el fraccionamiento de 3 µL en un gel de agarosa al 1% antes de almacenar a -80°C hasta el uso.

La región variable de la cadena pesada de Ig de cada hibridoma se amplificó utilizando una mezcla de cebadores 5' que comprendía 32 cebadores de secuencia líder específicos de ratón, diseñados para dirigirse al repertorio de V_H completo de ratón, en combinación con un cebador C_γ de ratón 3', específico de todos los isotipos de Ig de ratón. De manera similar, una combinación de cebadores que contenía treinta y dos secuencias líderes de V_k 5', diseñadas para amplificar cada una de las familias de ratones V_k, se usó en combinación con un único cebador inverso específico de la región constante kappa de ratón para amplificar y secuenciar la cadena ligera kappa. Para anticuerpos que contenían una cadena ligera lambda, la amplificación se realizó utilizando tres secuencias líderes de V_L 5', en combinación con un cebador inverso específico de la región constante lambda de ratón. Los transcritos de V_H y V_L se amplificaron a partir de 100 ng de ARN total, utilizando el kit Qiagen One Step RT-PCR de la siguiente manera. Se ejecutaron un total de ocho reacciones de RT-PCR para cada hibridoma, cuatro para la cadena ligera V_k y cuatro para la cadena pesada V_γ. Las mezclas de reacción de PCR incluían 3 µL de ARN, 0,5 µL de 100 µM de o bien cebadores de la cadena ligera kappa o de la cadena pesada (sintetizados a medida por Integrated Data Technologies), 5 µL de tampón para RT-PCR 5x, 1 µL de dNTPs, 1 µL de mezcla de enzimas que contenía transcriptasa inversa y ADN polimerasa y 0,4 µl de inhibidor de ribonucleasa RNasin (1 unidad). El programa del termociclador estaba en la etapa de RT a 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos seguido de 30 ciclos de (95°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto). A continuación había una incubación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de la PCR extraídos se secuenciaron utilizando los mismos cebadores específicos de la región variable que los descritos anteriormente para la amplificación de las regiones variables. Para preparar los productos de la PCR para la secuenciación directa de ADN, se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick™ (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN eluyó de la columna de centrifugación utilizando 50 µl de agua estéril y luego se secuenció directamente desde ambas cadenas. Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando la herramienta de análisis de secuencias IMGT (http://www.imgt.org/IMGT/sequence_analysis.html) para identificar los miembros de los genes V, D y J de la línea germinal con la mayor homología de secuencia. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de ADN conocidas de la línea germinal de las regiones V y J de Ig mediante una alineación de los genes de V_H y V_L con la base de datos de la línea germinal del ratón, utilizando una base de datos de secuencias de anticuerpos del propietario.

Más específicamente, la FIG. 3A representa las secuencias de aminoácidos contiguas de numerosas regiones variables novedosas de la cadena ligera murina de anticuerpos anti-DLL3 y regiones variables de la cadena ligera humanizada ejemplares, obtenidas a partir de cadenas ligeras murinas representativas. Del mismo modo, la FIG. 3B representa las secuencias de aminoácidos contiguas de numerosas regiones variables novedosas de la cadena pesada murina de los mismos anticuerpos anti-DLL3 y regiones variables de la cadena pesada humanizada, ejemplares, obtenidas a partir de los mismos anticuerpos murinos que proporcionan las cadenas ligeras humanizadas. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y pesada de murino se proporcionan en SEQ ID NOS: 21 - 387, números impares, mientras que las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y pesada humanizadas se proporcionan en SEQ ID NOS: 389 - 407, números impares.

Por lo tanto, tomadas juntas las FIGS. 3A y 3B proporcionan las secuencias anotadas de diversos anticuerpos anti-DLL3 murinos operables (denominados SC16,3, SC16,4, SC16,5, SC16,7, SC16,8, SC16,10, SC16,11, SC16,13, SC16,15, SC16,18, SC16,19, SC16,20, SC16,21, SC16,22, SC16,23, SC16,25, SC16,26, SC16,29, SC16,30, SC16,31, SC16,34, SC16,35, SC16,36, SC16,38, SC16,41, SC16,42, SC16,45, SC16,47, SC16,49, SC16,50, SC16,52, SC16,55, SC16,56, SC16,57, SC16,58, SC16,61, SC16,62, SC16,63, SC16,65, SC16,67, SC16,68, SC16,72, SC16,73, SC16,78, SC16,79, SC16,80, SC16,81, SC16,84, SC16,88, SC16,101, SC16,103, SC16,104, SC16,105, SC16,106, SC16,107, SC16,108, SC16,109, SC16,110, SC16,111, SC16,113, SC16,114, SC16,115, SC16,116, SC16,117, SC16,118, SC16,120, SC16,121, SC16,122, SC16,123, SC16,124, SC16,125, SC16,126, SC16,129, SC16,130, SC16,131, SC16,132, SC16,133, SC16,134, SC16,135, SC16,136, SC16,137, SC16,138, SC16,139, SC16,140, SC16,141, SC16,142, SC16,143, SC16,144, SC16,147, SC16,148, SC16,149 y SC16,150) y anticuerpos humanizados a modo de ejemplo (denominados hSC16.13, hSC16.15, hSC16.25, hSC16.34 y hSC16.56). Se debe tener en cuenta que estas mismas designaciones se pueden referir al clon que produce el anticuerpo objeto y, como tal, al uso de cualquier designación particular se debe interpretar en el contexto de la descripción que lo rodea.

Para los fines de la presente solicitud, las SEQ ID NOS de cada anticuerpo particular son números impares secuenciales. Por lo tanto, el mAb SC16.3 comprende los aminoácidos de SEQ ID NOS: 21 y 23 para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. A este respecto, SC16.4 comprende las SEQ ID NOS: 25 y 27, SC16.5 comprende las SEQ ID NOS: 29 y 31, y de este modo sucesivamente. La correspondiente secuencia de

ácido nucleico para cada secuencia de aminoácidos del anticuerpo se incluye en la lista de secuencias adjunta y tiene la SEQ ID NO inmediatamente anterior a la correspondiente SEQ ID NO del aminoácido. Por lo tanto, por ejemplo, las SEQ ID NOS de las V_L y V_H del anticuerpo SC16.3 son 21 y 23, respectivamente, y las SEQ ID NOS de las secuencias de ácido nucleico de las V_L y V_H del anticuerpo SC16.3 son SEQ ID NOS: 20 y 22, respectivamente.

- 5 Con respecto a las secuencias indicadas, se debe observar que, debido a anomalías en la secuenciación, ciertas secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera se truncaron prematuramente durante el procedimiento. Esto dio lugar a la omisión de uno o varios aminoácidos en la secuencia estructural 4 indicada. En tales casos, se han suministrado aminoácidos compatibles (determinados mediante una revisión de las secuencias correspondientes de otros clones) para completar esencialmente la secuencia de la región variable del sujeto. Por ejemplo, los
10 residuos "IK" se añadieron al extremo terminal de la secuencia de la cadena ligera de SC16.22 en la FIG. 3A (SEQ ID NO: 73) para proporcionar una región variable de la cadena ligera operable con una región estructural 4 completa. Las bases que codifican los aminoácidos añadidos se añadieron de manera similar a la secuencia de ácido nucleico correspondiente (SEQ ID NO: 72) para asegurar la coherencia. En cada uno de estos casos, en las FIGS. 3A y 3B (pero no en la lista de secuencias adjunta), los aminoácidos añadidos están subrayados y en negrita para que sean
15 fácilmente identificables.

Ejemplo 4

Generación de anticuerpos anti-DLL3 quiméricos y humanizados

Como se ha mencionado anteriormente, ciertos anticuerpos murinos del Ejemplo 2 (SC16.13, SC16.15, SC16.25, SC16.34 y SC16.56) se utilizaron para obtener anticuerpos quiméricos que comprendían regiones constantes humanas con regiones variables murinas y anticuerpos humanizados que comprendían CDRs murinas injertadas en un anticuerpo aceptor humano. En casos preferidos, esos anticuerpos obtenidos (quiméricos o humanizados) se pueden incorporar en los conjugados de DLL3 descritos.

Más específicamente, se generaron anticuerpos anti-DLL3 quiméricos utilizando métodos reconocidos en la técnica de la siguiente manera. El ARN total se extrajo de los hibridomas y se amplificó como se muestra en el Ejemplo 3. Los datos relativos a los segmentos de los genes V, D y J de las cadenas V_H y V_L de los anticuerpos murinos, se obtuvieron a partir de las secuencias de ácido nucleico derivadas. Se diseñaron conjuntos de cebadores específicos de la secuencia líder de la cadena V_H y V_L del anticuerpo, utilizando los siguientes sitios de restricción: Agel y XhoI para los fragmentos V_H , y XmaI y DraIII para los fragmentos V_L . Los productos de la PCR se purificaron con un kit de purificación de PCR Qiaquick (Qiagen), seguido de una digestión con las enzimas de restricción Agel y XhoI para los
25 fragmentos V_H y XmaI y DraIII para los fragmentos V_L . Los productos de la PCR digeridos de V_H y V_L se purificaron y se ligaron, respectivamente, en un vector de expresión de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO. 6) o un vector de expresión de la región constante de la cadena ligera humana de kappa C_L (SEQ ID NO. 5).

Las reacciones de ligación se realizaron de la siguiente manera en un volumen total de 10 μ L con 200 U de la ADN Ligasa de T4 (New England Biolabs), 7,5 μ L del producto de la PCR específico del gen, digerido y purificado y 25 ng de ADN del vector linealizado. Las bacterias DH10B de *E. coli* competentes (Life Technologies) se transformaron mediante choque térmico a 42°C con 3 μ L de producto de ligación y se colocaron en placas con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL. Después de la purificación y la digestión de los productos de ligación amplificados, los fragmentos V_H se clonaron en los sitios de restricción Agel-XhoI del vector de expresión pEE6.4HulgG1 (Lonza) y los fragmentos V_L se clonaron en los sitios de restricción XmaI-DraIII del vector de expresión pEE12.4Hu-Kappa (Lonza).
35

Los anticuerpos quiméricos se expresaron mediante cotransfección de células HEK-293T con los vectores de expresión pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa. Antes de la transfección, las células HEK-293T se cultivaron en placas de 150 mm en condiciones convencionales en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con 10% de FCS inactivado por calor, 100 μ g/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina G. Para las transfecciones transitorias, las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia. Se añadieron 12,5 μ g de cada uno de los ADN de los vectores pEE6.4HulgG1 y pEE12.4Hu-Kappa a 50 μ l de reactivo de transfección de HEK-293T en 1,5 ml de Opti-MEM. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se sembró en placas. Los materiales sobrenadantes se recogieron de tres a seis días después de la transfección. Los materiales sobrenadantes del cultivo que contenían anticuerpos quiméricos recombinantes, se retiraron de los desechos celulares mediante centrifugación a 800 x g durante 10 minutos y se almacenaron a 4°C. Los anticuerpos quiméricos recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A.
45

Los mismos anticuerpos anti-DLL3 murinos (por ejemplo, SC16.13, SC16.15, SC16.25, SC16.34 y SC16.56) también se utilizaron para obtener anticuerpos injertados con CDRs o humanizados. A este respecto, los anticuerpos murinos se humanizaron utilizando un método propio para injertar CDRs, asistido por ordenador (Abysis Database, UCL Business) y las técnicas convencionales de ingeniería molecular del modo siguiente. Las regiones estructurales humanas de las regiones variables se diseñaron basándose en la mayor homología entre las secuencias estructurales y las estructuras canónicas de CDRs de las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana, y las secuencias estructurales y las CDRs de los anticuerpos de ratón relevantes. Para los fines del análisis, la asignación
55

de aminoácidos a cada uno de los dominios de CDRs se realizó de acuerdo con la numeración de Kabat et al. Una vez que se seleccionaron las regiones variables, se generaron a partir de segmentos genéticos sintéticos (Integrated DNA Technologies). Los anticuerpos humanizados se clonaron y se expresaron utilizando los métodos moleculares descritos anteriormente para los anticuerpos quiméricos.

- 5 La composición genética de las regiones variablesceptoras humanas seleccionadas, se muestra en la TABLA 3 inmediatamente a continuación para cada uno de los anticuerpos humanizados. Las secuencias representadas en la TABLA 3 corresponden a las secuencias de las cadenas pesada y ligera anotadas, indicadas en las FIGS. 3A y 3B para los clones objeto. Más específicamente, las entradas en la TABLA 3 a continuación se corresponden con las secuencias de regiones variables contiguas indicadas en SEQ ID NOS: 389 y 391 (hSC16.13), SEQ ID NOS: 393 y 395 (hSC16.15), SEQ ID NOS: 397 y 399 (hSC16.25), SEQ ID NO: 401 y 403 (hSC16.34) y SEQ ID NO: 405 y 407 (hSC16.56). Además de la composición genética, la TABLA 3 muestra que, en esos casos seleccionados, no fueron necesarios cambios en la estructura o retromutaciones para mantener las propiedades de unión favorables de los anticuerpos seleccionados. Por supuesto, en otras estructuras artificiales injertadas con CDRs se apreciará que tales cambios estructurales o retromutaciones pueden ser deseables y, como tales, se contemplan expresamente como dentro del alcance de la presente descripción.

TABLA 3

mAb	VH humana	DH humana	JH humana	Cambios de FW	VK humana	JK humana	Cambios de FW
hSC16,13	IGHV2-5*01	IGHD1-1	JH6	Ninguno	IGKV1-39*01	JK1	Ninguno
hSC16,15	IGHV1-46*01	IGHD2-2	JH4	Ninguno	IGKV1-13*02	JK4	Ninguno
hSC16,25	IGHV2-5*01	IGHD3-16	JH6	Ninguno	IGKV6-21*01	JK2	Ninguno
hSC16,34	IGHV1-3*02	IGHD3-22	JH4	Ninguno	IGKV1-27*01	JK1	Ninguno
hSC16,56	IGHV1-18*01	IGHD2-21	JH4	Ninguno	IGKV3-15*01	JK2	Ninguno

- 20 Aunque no se alteraron los residuos en las regiones estructurales, en uno de los clones humanizados (hSC16.13) se introdujeron mutaciones en la CDR2 de la cadena pesada para abordar problemas de estabilidad. La afinidad de la unión del anticuerpo con la CDR modificada se verificó para garantizar que era equivalente a la del anticuerpo quimérico o murino correspondiente.

- 25 Tras la humanización de todos los anticuerpos seleccionados mediante injerto de CDRs, se analizaron las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada resultantes para determinar su homología con respecto a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del donante murino y del aceptor humano. Los resultados, mostrados en la TABLA 4 inmediatamente a continuación, revelan que las estructuras artificiales humanizadas mostraban consistentemente una mayor homología con respecto a las secuenciasceptoras humanas que con las secuencias de donantes murinos. Más particularmente, las regiones variables de la cadena ligera y pesada murinas muestran un porcentaje de homología general similar, con una coincidencia más cercana de los genes de la línea germinal humana (85%-93%), en comparación con la homología de los anticuerpos humanizados y las secuencias de proteínas del hibridoma donante (74%-83%).

TABLA 4

mAb	Homología con ser humano (aceptor de CDR)	Homología con el parental murino (donante de CDR)
hSC16,13 HC	93%	81%
hSC16,13 LC	87%	77%
hSC16,15 HC	85%	83%
hSC16,15 LC	85%	83%
hSC16,25 HC	91%	83%
hSC16,25 LC	85%	79%
hSC16,34 HC	87%	79%
hSC16,34 LC	85%	81%
hSC16,56 HC	87%	74%
hSC16,56 LC	87%	76%

Después de las pruebas, y como se explicará con más detalle a continuación, cada una de las estructuras artificiales humanizadas obtenidas mostraba características de unión favorables, aproximadamente comparables a las mostradas por los anticuerpos parentales murinos.

Ejemplo 5

5 Características de los anticuerpos anti-DLL3

Se usaron varios métodos para analizar las características de unión e inmunoquímicas de los moduladores de anticuerpos de DLL3 seleccionados, generados como se ha descrito anteriormente. Específicamente, varios moduladores de anticuerpos se caracterizaron por su afinidad, cinética, agrupación, ubicación de la unión y reactividad cruzada con respecto al reconocimiento de antígenos de ser humano, macaco cangrejero, rata y ratón (es decir, usando las células y las estructuras artificiales de proteína DLL3) mediante métodos reconocidos en la técnica que incluyen la citometría de flujo. Las afinidades y las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} de los moduladores seleccionados se midieron utilizando un análisis de interferometría de bio-capa en un ForteBio RED (ForteBio, Inc.) o resonancia de plasmón de superficie usando un Biacore 2000, cada uno de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados de la caracterización se exponen en forma tabular en la FIG. 5, en donde se puede observar que los moduladores seleccionados generalmente mostraban afinidades relativamente altas en el rango nanomolar y, en muchos casos, tenían reactividad cruzada. La FIG. 5 indica además la agrupación de anticuerpos determinada empíricamente así como el dominio DLL3 unido por el anticuerpo objeto según se determinó usando la expresión de un fragmento de antígeno mediada por levadura, tal como se describe con más detalle en el Ejemplo 6 inmediatamente a continuación.

En cuanto a la agrupación de anticuerpos, se usó ForteBio RED según las instrucciones del fabricante para identificar los anticuerpos competidores que se unían a las mismas agrupaciones o a diferentes. En resumen, se capturó un anticuerpo de referencia (Ab1) sobre un chip de captura anti-ratón, luego se utilizó una concentración elevada de anticuerpo no enlazante para bloquear el chip y se recogió una línea de base. A continuación, el anticuerpo específico (Ab1) capturó DLL3-Flag humano recombinante monomérico (Adipogen International) y la punta se sumergió en un pocillo con el mismo anticuerpo (Ab1) como control o en un pocillo con un anticuerpo de prueba diferente (Ab2). Si se observaba una unión adicional con un nuevo anticuerpo, se determinaba que Ab1 y Ab2 estaban en una agrupación diferente. Si no se producía una nueva unión, como se determinó comparando los niveles de unión con el control Ab1, se determinaba que Ab2 estaba en la misma agrupación. Como se conoce en la técnica, este procedimiento se puede expandir para escrutar grandes genotecas de anticuerpos únicos, utilizando una fila completa de anticuerpos que representan agrupaciones únicas en una placa de 96 pocillos. En el presente caso, este procedimiento para agrupar mostraba los anticuerpos escrutados unidos a al menos nueve agrupaciones diferentes (designadas como Bins A a I en la FIG. 5) sobre la proteína DLL3. Basándose en el tamaño aparente del antígeno DLL3 (en donde el ECD tiene aproximadamente 56 kD) y la resolución de la metodología de agrupamiento empleada, se cree que las nueve agrupaciones identificadas representan la mayoría de las agrupaciones presentes en el antígeno extracelular DLL3.

Además de evaluar los moduladores ejemplares como se ha expuesto anteriormente, se realizó una citometría de flujo para confirmar que los moduladores de anticuerpos SC16 seleccionados se pueden asociar inmunoespecíficamente con DLL3 humano y para determinar si los mismos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con DLL3 de macaco cangrejero, rata y/o murino. Más particularmente, los anticuerpos murinos ejemplares se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un FACSCanto II y células 293 que sobreexpresaban DLL3 murino, de rata, de macaco cangrejero, humano. En algunos casos, moduladores murinos ejemplares se analizaron mediante citometría de flujo usando un FACSCanto II y células de levadura que presentaban DLL3 de macaco cangrejero, usando los métodos descritos por Cochran et al. (J. Immunol Methods. 287 (1-2):147-158 (2004).

Basándose en la citometría de flujo, se encontró que todos los moduladores de anticuerpos seleccionados se unían a DLL3 humano sobreexpresado en células 293 (datos no mostrados), mientras que se encontró que varios de los anticuerpos analizados reaccionaban de forma cruzada con DLL3 de macaco cangrejero y/o murino (todos los anticuerpos que reaccionaban con ratón también reaccionaban con rata). En este sentido y tal y como se indica en la FIG. 5, se encontró que ocho de los trece moduladores que reaccionan inmunoespecíficamente con DLL3 humano también reaccionan con DLL3 murino (o de rata). Específicamente, se encontró que los mAbs SC16.4, SC16.8, SC16.15, SC16.34, SC16.39, SC16.46, SC16.51 y SC16.56 reaccionan de forma cruzada con DLL3 murino en mayor o menor grado, mientras que los mAbs SC16.7, SC16.10, SC16.13, SC16.25 y SC16.65 no se asociaron apreciablemente con DLL3 murino. Tales resultados no son inesperados dado que DLL3 murino es aproximadamente un 83% homólogo a la isoforma 2 de DLL3 humano. Se apreciará que esta reactividad cruzada se puede explotar ventajosamente en el contexto de la presente invención a través del uso de modelos animales en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Además de los ensayos mencionados anteriormente, se analizaron las estructuras artificiales humanizadas hSC16.13, hSC16.15, hSC16.25, hSC16.34 y hSC16.56 del Ejemplo 4 para determinar si el procedimiento de injertar CDRs había alterado apreciablemente sus características de unión. A este respecto, las estructuras artificiales humanizadas (con CDRs injertadas) se compararon con anticuerpos quiméricos "tradicionales" que comprendían los

dominios variables de la cadena ligera y pesada parentales (o donantes) murinos y una región constante humana sustancialmente equivalente a la utilizada en las estructuras artificiales humanizadas. Con estas estructuras artificiales, la resonancia de plasmón de superficie (SPR) se realizó utilizando un Biacore 2000 (GE Healthcare) para identificar cualquier cambio sutil en las constantes de las tasas, provocado por el proceso de humanización.

- 5 Basándose en una serie de concentraciones de 25 y 12,5 nM de antígeno DLL3 humano y utilizando un modelo de unión de Langmuir 1:1, la K_D de la unión del anticuerpo SC16.15 con el antígeno DLL3 humano se estimó que era de 0,2 nM. Después se realizaron experimentos similares con otras estructuras artificiales humanizadas y estructuras artificiales quiméricas para demostrar que conservan valores de afinidad terapéutica (datos no mostrados). Esos resultados demuestran que el proceso de humanización no tenía un impacto material sobre la afinidad de los modu-
10 ladores e indicaba que son candidatos viables para uso en los ADCs de DLL3 descritos.

Ejemplo 6

Cartografiado de dominios y epítomos de anticuerpos anti-DLL3

- 15 Con el fin de caracterizar y posicionar los epítomos con los que se asociaban o unían los conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco, se realizó un cartografiado de epítomos a nivel de dominio en numerosos anticuerpos ejemplares, utilizando una modificación del protocolo descrito por Cochran et al., 2004 (supra). Brevemente, dominios individuales de DLL3 que comprendían secuencias de aminoácidos específicas se expresaron en la superficie de levadura, y la unión con anticuerpos de DLL3 seleccionados se determinó mediante citometría de flujo.

- 20 Más específicamente, se crearon estructuras artificiales de plásmidos con presentación en levadura para la expresión de las siguientes estructuras artificiales: dominio extracelular de DLL3 (aminoácidos 27-466); quimera DLL1-DLL3, que consiste en la región N-terminal y el dominio DSL de DLL1 (aminoácidos 22-225) fusionados con los dominios de tipo EGF 1 a 6 de DLL3 (aminoácidos 220-466); quimera DLL3-DLL1, que consiste en la región N-terminal y el dominio DSL de DLL3 (aminoácidos 27-214) fusionados con los dominios de tipo EGF 1 a 8 de DLL1 (aminoácidos 222-518); dominio de tipo EGF nº 1 (aminoácidos 215-249); dominio de tipo EGF nº 2 (aminoácidos 274-310); dominios de tipo EGF nº 1 y nº 2 (aminoácidos 215-310); dominio de tipo EGF nº 3 (aminoácidos 312-351); dominio de tipo EGF nº 4 (aminoácidos 353-389); dominio de tipo EGF nº 5 (aminoácidos 391-427); y dominio de tipo EGF nº 6 (aminoácidos 429-465). (Para más información sobre los dominios, consúltese en general el registro Q9NYJ7 de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. Téngase en cuenta que la numeración de los aminoácidos es por referencia a una proteína DLL3 sin procesar con una secuencia líder tal como se establece en SEQ ID NO. 1). Para un análisis de la región N-terminal o los dominios EGF como un todo, se utilizaron quimeras con el miembro de la familia DLL1 (DLL1-DLL3 y DLL3-DLL1) en lugar de fragmentos para minimizar problemas potenciales con el plegamiento de proteínas. Anteriormente, se había mostrado que los anticuerpos cartografiados en un dominio no reaccionaban de forma cruzada con DLL1, lo que indicaba que cualquier unión con esas estructuras artificiales se estaba produciendo a través de la asociación con la porción DLL3 de la estructura artificial. Esos plásmidos se transformaron en levaduras, que luego se cultivaron y se indujeron como se describe en Cochran et al.

- 35 Para someter a ensayo la unión a una estructura artificial particular, 200.000 células de levadura inducidas que expresaban la estructura artificial deseada, se lavaron dos veces en PBS + 1 mg/ml de BSA (PBSA), y se incubaron en 50 µL de PBSA con un clon anti-HA biotinilado 3F10 (Roche Diagnostics) a 0,1 µg/mL y anticuerpo purificado 50 nM o una dilución 1:2 de material sobrenadante no purificado de hibridomas cultivados durante 7 días. Las células se incubaron durante 90 minutos sobre hielo, seguido de 2 lavados en PBSA. Luego, las células se incubaron en 50 µl de PBSA con los anticuerpos secundarios apropiados: para anticuerpos murinos se añadieron estreptavidina conjugada con Alexa 488 y anti-ratón de cabra conjugado con Alexa 647 (ambos de Life Technologies) a 1 µg/ml cada uno, y para anticuerpos humanizados o quiméricos se añadieron estreptavidina conjugada con Alexa 647 (Life Technologies) y anti-humano de cabra conjugado con R-ficoeritrina (Jackson Immunoresearch) a 1 µg/ml cada uno. Después de una incubación de veinte minutos sobre hielo, las células se lavaron dos veces con PBSA y se analizaron en un FACS Canto II. Los anticuerpos que se unían a la quimera DLL3-DLL1 se indicó que se unían a la región N-terminal + DSL. De los anticuerpos que se unían específicamente a un epítopo presente en un dominio de tipo EGF particular, se indicó que se unían a su dominio respectivo.

- 50 Con el fin de clasificar un epítopo como conformacional (por ejemplo, discontinuo) o lineal, la levadura que presentaba el dominio extracelular de DLL3 se trató con calor durante 30 minutos a 80°C, y luego se lavó dos veces en PBSA helado. Las levaduras que presentaban el antígeno desnaturalizado (levadura desnaturalizada) se sometieron luego al mismo protocolo de tinción y a un análisis de citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos que se unían tanto a la levadura desnaturalizada como a la natural, se clasificaron como que se unían a un epítopo lineal, mientras que los anticuerpos que se unían a la levadura natural pero no la levadura desnaturalizada, se clasificaron como conformacionalmente específicos.

- 55 En la FIG. 4 se presenta un resumen esquemático de los datos de cartografiado de los epítomos a nivel de dominio de los anticuerpos sometidos a ensayo, en donde los anticuerpos que se unen a un epítopo lineal están subrayado y, cuando se determina, la agrupación correspondiente se indica entre paréntesis. Una revisión de la FIG. 4 muestra que la mayoría de los moduladores tendían a estar cartografiados en epítomos encontrados en la región N-terminal/DSL de DLL3 o en el segundo dominio de tipo EGF. Como se ha mencionado anteriormente, la FIG. 5 pre-

señala datos similares con respecto a la determinación de agrupaciones y el cartografiado de dominios para una serie de moduladores seleccionados en forma tabular.

A continuación se realizó un cartografiado fino de los epítomos en anticuerpos seleccionados, utilizando uno de dos métodos. El primer método empleaba el kit de la genoteca de péptidos que se presentan en fagos Ph.D.-12 (New England Biolabs E8110S) que se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, un tubo Nunc MaxiSorp (Nunc) se recubrió durante una noche con el anticuerpo para el cartografiado de epítomos a 50 µg/ml en 3 ml de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,. El tubo se bloqueó con solución de BSA al 3% en solución de bicarbonato. Después, se permitió que 10¹¹ fagos aportados en PBS + Tween-20 al 0,1% se unieran, seguido de diez lavados consecutivos en Tween-20 al 0,1% para eliminar por lavado los fagos no unidos. Los fagos restantes se eluyeron con 1 ml de glicina 0,2 M durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, seguido de neutralización con 150 µl de Tris-HCl 1 M a pH 9. Los fagos eluidos se amplificaron y se clasificaron nuevamente con 10¹¹ fagos aportados, utilizando Tween-20 al 0,5% durante las etapas de lavado para aumentar el rigor de la selección. El ADN de 24 placas del fago eluido procedente de la segunda ronda, se aisló utilizando el kit Qiaprep M13 Spin (Qiagen) y se secuenció. La unión de los fagos clónicos se confirmó mediante un ensayo ELISA, en donde una placa de ELISA se recubría con el anticuerpo cartografiado o un anticuerpo de control, se bloqueaba y se exponía a cada clon de fago. La unión de los fagos se detectó utilizando el anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y la solución de ELISA Turbo TMB de 1 etapa (Pierce). Las secuencias peptídicas fágicas procedentes de fagos que se unían específicamente, se alinearon utilizando el Vector NTI (Life Technologies) frente a la secuencia peptídica ECD del antígeno para determinar el epítomo de unión.

Alternativamente, un método de presentación en levadura (Chao et al., Nat Protoc. 1(2): 755-768, 2007) se usó para cartografiar epítomos de anticuerpos seleccionados. Brevemente, se generaron genotecas de mutantes ECD de DLL3 con PCR propensa a error, utilizando análogos de nucleótidos 8-oxo-2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato y 2'-desoxi-p-nucleósido-5'-trifosfato (ambos de TriLink Bio) para una tasa de mutagénesis de la diana de una mutación de aminoácido por clon. Estos se transformaron en un formato de presentación en levadura. Utilizando la técnica descrita anteriormente para el cartografiado a nivel de dominio, la genoteca se tiñó para determinar la unión de HA y anticuerpo a 50 nM. Usando un FACS Aria (BD), se clasificaron los clones que mostraban una pérdida de unión en comparación con ECD de DLL3 de tipo silvestre. Estos clones se volvieron a cultivar y se sometieron a otra ronda de clasificación por FACS para estudiar la pérdida de unión con el anticuerpo diana. Utilizando el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research), se aislaron y se secuenciaron clones de ECD individuales. Cuando era necesario, las mutaciones se reformatearon como clones de ECD de un solo mutante utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de Quikchange (Agilent).

Los clones individuales de ECD se escrutaron a continuación para determinar si la pérdida de unión se debía a una mutación en el epítomo, o a una mutación que causaba un plegamiento incorrecto. Las mutaciones que implicaban codones de cisteína, prolina y de parada se descartaron automáticamente debido a la alta probabilidad de una mutación de plegamiento incorrecto. Los clones de ECD restantes se escrutaron a continuación para determinar la unión a un anticuerpo no competitivo, conformacionalmente específico. Se concluyó que los clones de ECD que perdían la unión a anticuerpos no competitivos y conformacionalmente específicos, contenían mutaciones de plegamiento incorrecto, mientras que los clones de ECD que conservaban una unión equivalente a la de ECD de DLL3 de tipo silvestre, estaban plegados correctamente. Se concluyó que las mutaciones en los clones de ECD en el último grupo estaban en el epítomo. Los resultados se indican en la TABLA 5 inmediatamente a continuación.

TABLA 5

Clon de anticuerpo	Epítomo	SEQ ID NO:
SC16,23	Q93, P94, G95, A96, P97	3
SC16,34	G203, R205, P206	4
SC16,56	G203, R205, P206	4

Más particularmente, un resumen de los anticuerpos seleccionados con sus epítomos derivados que comprenden residuos de aminoácidos que están involucrados en la unión de anticuerpos, se indica en la TABLA 5. A este respecto, los anticuerpos SC16.34 y SC16.56 interactúan aparentemente con residuos de aminoácidos comunes, lo que es consistente con la información de la agrupación y los resultados del cartografiado de dominio mostrados en la FIG. 4. Además, se encontró que SC16.23 interactuaba con un epítomo contiguo distinto y se encontró que no se agrupaba con SC16.34 o SC16.56.

Ejemplo 7

50 Preparación de conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco

Para demostrar aún más la versatilidad de la presente descripción, los conjugados de anticuerpo anti-DLL3 y fármaco sustancialmente como se indican en los ADCs 1 - 5, se preparan conjugando compuestos de DL1 - DL5 con anti-

cuerpos de DLL3, tales como los descritos en el presente documento. A este respecto, se apreciará que, debido al enlazador elegido para DL4, se emplean dos procedimientos de conjugación ligeramente diferentes para proporcionar los conjugados descritos. Más específicamente, los ADCs 1 - 3 y 5 se preparan preferiblemente usando el primer procedimiento de conjugación más abajo y el ADC 4 se prepara preferiblemente usando el segundo procedimiento a continuación.

5 (a) Conjugación de maleimido

Más específicamente, se preparan conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco que comprenden dímeros de enlazador y pirrolobenzodiazepina (PBD) indicados en DL1 - DL3 y DL5, fijados covalentemente a los anticuerpos descritos (véase, en general, los documentos U.S.P.Ns. 2011/0256157 y 2012/0078028 y U.S.P.N 6.214.345).

10 Las combinaciones de fármaco y enlazador de DL1 - DL3 y DL5 se sintetizan y se purifican sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior y usando métodos reconocidos en la técnica. Después de la preparación, la unidad de fármaco y enlazador que comprende un resto maleimido terminal, se conjuga con un sulfhidrilo libre en el anticuerpo de DLL3 seleccionado. A este respecto, los conjugados de DLL3 se preparan a través de una reducción parcial del anticuerpo de DLL3 seleccionado, con tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP), seguida por la reacción de los
15 residuos Cys reducidos con la carga útil de maleimido-enlazador.

Más particularmente, el modulador de anticuerpo de DLL3 seleccionado se reduce con 1,3 moles de tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) por mol de mAb durante 90 minutos a 20°C en Tris 200 mM, pH 7,5 y tampón EDTA 32 mM. La reacción se deja enfriar a 15°C y la carga útil del enlazador se disuelve en DMA y luego se añade en una relación de 3,2 moles/mol de mAb precedida por una cantidad adicional de DMA hasta tener una concentración final del 6% (v/v). La reacción continúa durante 30 minutos. El fármaco y enlazador sin reaccionar se restringe mediante la adición de un exceso molar equivalente de N-acetil cisteína. Los conjugados, sustancialmente como se exponen en los ADCs 1-3 y 5, se purifican a continuación mediante una columna de intercambio iónico, utilizando un sistema FPLC AKTA Explorer (G.E. Healthcare) para eliminar el anticuerpo de alto peso molecular, el codisolvente y las moléculas pequeñas agregadas. En el conjugado eluido se intercambia luego el tampón por filtración de flujo tangencial (TFF) con un tampón de formulación, seguido de un ajuste de la concentración y la adición de un detergente. El conjugado final se analiza para determinar la concentración de proteína (con una medición UV), la agregación (SEC), la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) mediante HPLC de fase inversa (RP), la presencia de anticuerpo no conjugado mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) HPLC, los materiales no proteicos por RP HPLC y la citotoxicidad *in vitro* utilizando una línea celular que expresa DLL3.

30 (b) Conjugación de yodoacetamida

El ADC 4 se prepara sustancialmente de la siguiente manera. Se sintetiza DL4 y se proporciona como se muestra en el Ejemplo 1. Después de la preparación, la unidad de citotoxina-enlazador que comprende un resto yodoacetamida terminal se conjuga con un sulfhidrilo libre en el anticuerpo de DLL3 seleccionado. A este respecto, los conjugados de DLL3 se preparan a través de una reducción parcial del anticuerpo de DLL3 seleccionado con tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP), seguido de una reacción de los residuos Cys reducidos con la carga útil de yodoacetamida-enlazador.

Más particularmente, el modulador del anticuerpo de DLL3 seleccionado se reduce con 1,8 moles de TCEP por mol de mAb durante 90 minutos a 20°C en PBS pH 7,2 y tampón EDTA 5 mM. La solución de anticuerpo reducida se ajusta luego a pH 8,5 con borato de sodio 100 mM y la carga útil de enlazador en DMSO se añade en una proporción de al menos 5 moles/mol de mAb precedida por una cantidad adicional de DMSO hasta una concentración final del 6% (v/v). La reacción continúa luego durante la noche a 20°C. En el conjugado se intercambia luego el tampón mediante filtración de flujo tangencial (TFF) con un tampón de diafiltración, seguido de un ajuste de la concentración y la adición de un detergente. Después se analiza el conjugado final para determinar la concentración de proteína (con una medición UV), la agregación (SEC), la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) por HPLC de fase inversa (RP), y la citotoxicidad *in vitro* utilizando una línea celular que expresa DLL3.

Utilizando los procedimientos mencionados anteriormente, o una metodología sustancialmente similar conocida en la técnica, se generan y caracterizan una serie de conjugados que comprenden combinaciones de diversos moduladores de anticuerpos de DLL3 y restos DL, tal y como se describe en el presente documento. En este sentido, la FIG. 6 proporciona un resumen de los ADCs que se pueden generar de acuerdo con la presente descripción mediante la conjugación de un anticuerpo específico (por ejemplo, SC16.3) con un fármaco-enlazador seleccionado (por ejemplo, DL1) para proporcionar el ADC correspondiente (es decir, SC16.3-DL1 o SC16.3-ADC1). Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de las designaciones de anticuerpos en las estructuras artificiales ejemplares de la FIG. 6, excepto aquellas identificadas como humanizadas (por ejemplo, hSC16.34-DL4), pueden representar cualquier tipo de anticuerpo (quimérico, humanizado, humano, IgG1, IgG3, etc., versiones de los clones murinos identificados) o fragmentos inmunorreactivos de los mismos. Además, se apreciará que los compuestos ADC 1, ADC 2, ADC 3 y ADC 5 ejemplares se conjugan usando el protocolo indicado en el Ejemplo 7(a) mientras que los compuestos ADC 4 ejemplares se conjugan usando el protocolo indicado en el Ejemplo 7(b). Se apreciará que, en aspectos seleccionados, la presente invención comprende un conjugado tal y como se muestra en la FIG. 6.

Ejemplo 8**Ensayo *in vitro* de la destrucción de células tumorales usando conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco**

Para demostrar que los ADCs de DLL3 de la presente invención son capaces de mediar en la administración de un agente citotóxico a células vivas, ensayos de destrucción celular *in vitro* se realizan utilizando conjugados de DLL3 seleccionados preparados según los Ejemplos anteriores.

Se evalúan *in vitro* los ADCs dirigidos a DLL3 dotados con una de varias cargas útiles de PBD (es decir, PBD 1 - PBD 5) y se unen, con una afinidad nanomolar, específicamente a DLL3 en células 293 humanas modificadas genéticamente para sobreexpresar DLL3 humano, pero no a células 293 parentales vírgenes. Para explorar el potencial citotóxico de los ADCs 1 - 5 seleccionados *in vitro*, se evalúa su capacidad para destruir células 293 que sobreexpresan DLL3 humano. Específicamente, las células 293T parentales o las células 293T modificadas genéticamente para expresar DLL3, se incuban con diluciones de los ADCs 1 - 5 seleccionados durante un período de 48 a 72 horas, antes de evaluar la viabilidad celular utilizando Cell Titer Glo® (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los ADCs que destruyen las células 293 que sobreexpresan DLL3 con una CI50 de 0,1 - 100 pM, pero que demuestran poca o ninguna capacidad para destruir células 293 parentales vírgenes, se seleccionan como candidatos preclínicos.

Basándose en los ensayos de citotoxicidad con 293, los conjugados se seleccionan para un examen adicional con células tumorales. Inicialmente, se disocian 2.500 células/pocillo de KDY66 humano, un NET NTX renal que expresa DLL3 endógeno, en una suspensión de una sola célula y se colocan en placas BD Primaria™ (BD Biosciences) en medios exentos de suero complementados con factor de crecimiento, tal y como se conoce en la técnica. Después de un período de 24 horas, varias concentraciones (0,1 - 100 pM) de conjugados de anticuerpo de DLL3 purificados, por ejemplo, SC16.26-DL1, SC16.81-DL2, SC16.118-DL4 y SC16.67-DL5, junto con controles adecuados (por ejemplo, conjugados de IgG1-DL que no se unen), se añaden a los cultivos. Después de un período de siete días, las placas se examinan para determinar el impacto de los conjugados de anticuerpo de DLL3 sobre la viabilidad celular. La capacidad de los conjugados de anticuerpo y fármaco para internalizarse y destruir células tumorales, se determina con un recuento de la cantidad de células viables utilizando Cell Titer Glo® según las instrucciones del fabricante. Los recuentos con luminiscencia sin procesar que utilizan cultivos que contienen células expuestas a controles de isotipo de anticuerpo del conjugado, se establecen como valores de referencia del 100% y todos los demás recuentos se calculan en consecuencia. Se espera que algunos o todos los conjugados de DLL3 destruyan células tumorales KDY66 con una CI50 entre 0,1 pM y 100 pM, y que los controles de isotipo del conjugado muestren valores de CI50 extremadamente altos.

Los conjugados de anticuerpos de DLL3 activos se analizan en un ensayo de dilución para determinar los valores de CE50 para la actividad. Usando el mismo ensayo que se ha descrito inmediatamente antes, los conjugados de anticuerpos seleccionados y los controles de conjugados apropiados se incuban con células tumorales de ovario extendidas en placas (por ejemplo, OV26, un tumor NET NTX de ovario). Se espera que algunos de todos los conjugados muestren una destrucción eficaz de las células tumorales ováricas con valores de CE50 medidos en el intervalo de picomolar o subpicomolar. A la inversa, se espera que los ADCs de control muestren valores de CE relativamente altos, lo que indica que no están internalizados de manera efectiva y que el fármaco conjugado permanece en un estado inactivo.

Para demostrar aún más la versatilidad de la invención descrita, las células tumorales obtenidas a partir de un carcinoma de pulmón neuroendocrino de células grandes (LU37) se exponen a conjugados seleccionados (por ejemplo, SC16.26-DL1, SC16.81-DL2 y SC16.67-DL5) de acuerdo con las enseñanzas de este documento. Más específicamente, 2.500 células LU37 NTX por pocillo se extienden en placas (placas BD Primaria™) en medio sin suero complementado con factor de crecimiento, un día antes de la adición de los anticuerpos de DLL3 conjugados y los controles de isotipos conjugados. Las células extendidas en placas se exponen a diversas concentraciones de los conjugados de DLL3 y de los conjugados de control durante siete días. Después de la exposición, la viabilidad celular se determina con un recuento de la cantidad de células viables utilizando Cell Titer Glo® como se ha descrito anteriormente. Se espera que los conjugados de DLL3 eliminen eficazmente las células tumorales en concentraciones clínicamente relevantes. Por ejemplo, se espera que los conjugados de DLL3 posean la capacidad de destruir el 50% de las células LU37 *in vitro* a concentraciones de menos de aproximadamente 100 pM, mientras que los conjugados de control de isotipo requieren concentraciones de >1 nM para destruir el 50% de las células tumorales.

Tales resultados indicarían que los conjugados descritos son útiles para el tratamiento de una variedad de trastornos neoplásicos.

Ejemplo 9**Ensayo *in vivo* de la supresión del crecimiento tumoral usando conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco**

En vista de los resultados *in vitro* mencionados anteriormente, se realizan experimentos para evaluar la capacidad de los ADCs de DLL3 descritos para reducir y suprimir el crecimiento de tumores humanos que expresan DLL3 *in vivo*. Los conjugados de DLL3 seleccionados más particularmente que comprenden moduladores murinos y humanizados se someten a ensayo para demostrar su capacidad para suprimir el crecimiento tumoral de NTX humano en

ratones inmunodeficientes.

Para preparar los experimentos, tumores NTX obtenidos a partir de un paciente (LU37, LU73 y OV26) se cultivan de forma subcutánea en los flancos de ratones hembras NOD/SCID utilizando métodos reconocidos en la técnica. Los volúmenes de los tumores y los pesos de los ratones se controlan dos veces por semana. Cuando los volúmenes tumorales alcanzan los 150-250 mm³, los ratones se asignan al azar a grupos de tratamiento y se les administran inyecciones con varias dosis de conjugados de DLL3, por ejemplo, SC16.21-DL2, SC16.144-DL4, hSC16.34-DL5, hSC16.56-DL1, o controles de isotipo que comprenden los mismos DLs (cada uno producido sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 7 anterior) a través de una inyección intraperitoneal. Los ratones reciben tres inyecciones iguales de ADCs a 0,1 - 1 mg/kg, espaciadas uniformemente a lo largo de siete días. Después del tratamiento, los volúmenes de los tumores y los pesos de los ratones se controlan hasta que los tumores superan los 800 mm³ o los ratones enferman.

En mayor o menor medida, se espera que los conjugados de DLL3 seleccionados muestren la capacidad de reducir el volumen tumoral o suprimir el crecimiento tumoral. En algunos casos, se espera que la supresión del crecimiento del tumor sea duradera, por ejemplo, que dure hasta 30 días, 40 días, 50 días, 60 días o más con respecto a cada una de las tres líneas de células tumorales diferentes. La capacidad de varios moduladores conjugados, incluyendo los conjugados humanizados, para retardar o suprimir el crecimiento tumoral *in vivo* durante períodos prolongados, validaría aún más el uso de los conjugados de DLL3 descritos como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos proliferativos.

Ejemplo 10

20 Ensayo de reducción de la frecuencia de células madre cancerosas usando conjugados de anticuerpo de DLL3 y fármaco

Como se ha expuesto en los Ejemplos anteriores, se espera que los conjugados de DLL3 descritos sean eficaces para suprimir el crecimiento tumoral. Además, como se ha descrito anteriormente, la expresión de DLL3 está asociada con células madre de cáncer que generalmente se sabe que son resistentes a fármacos y que alimentan la recidiva del tumor y la metástasis. En consecuencia, para demostrar que el tratamiento con ADCs de DLL3 reduce el potencial de recidiva de las líneas NTX, se realizan ensayos de dilución limitante (LDA) *in vivo* para determinar la frecuencia de las células madre cancerosas en tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas después del tratamiento con conjugados de DLL3, por ejemplo, hSC16.13-DL2 o hSC16.34-DL5.

Un tumor de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas obtenido a partir de un paciente (LU95) y un xenoinjerto obtenido a partir de un paciente de un carcinoma de células renales papilares (KDY66), se cultivan por vía subcutánea en ratones hospedadores inmunodeficientes. Cuando los volúmenes tumorales promedian los 150 mm³ - 250 mm³, los ratones se segregan al azar en dos grupos de siete ratones. Mediante inyección intraperitoneal, los ratones reciben inyecciones los días 0, 4 y 7, e IgG1-DL2 humana o IgG1-DL5 humana (1 mg/kg; n = 7 ratones cada uno) como controles negativos o con conjugados de DLL3, por ejemplo, hSC16.13-DL2 o hSC16.34-DL5 (1 mg/kg; n = 7 ratones cada uno). El día 8, se sacrifican dos ratones representativos de cada grupo (cuatro en total) y se recogen sus tumores y se dispersan en suspensiones de una sola célula. Se espera que los tumores tratados con los conjugados de control del isotipo continúen creciendo en los cinco ratones restantes, mientras que los volúmenes de los tumores tratados con conjugados de DLL3 se reduzcan a cero o casi a cero en los cinco ratones restantes.

Usando técnicas convencionales de citometría de flujo y un anticuerpo anti-DLL3 marcado, los tumores recogidos a partir de cada uno de los cuatro grupos de tratamiento, se evalúan para confirmar la expresión positiva de DLL3. Las células tumorales de cada grupo de tratamiento respectivo se agrupan y las células humanas vivas se aíslan mediante FACS utilizando un FACSAria III (Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los métodos reconocidos en la técnica. Brevemente, las células se marcan con anticuerpos conjugados con FITC H2Kd anti-murinos y anticuerpos CD45 anti-murinos (ambos BioLegend, Inc.) y luego se resuspenden en 1 µg/ml de DAPI. La suspensión resultante se clasifica a continuación en condiciones convencionales con células humanas DAPI⁺, mH2Kd⁻ y mCD45⁻ que se recogen y las células murinas se descartan.

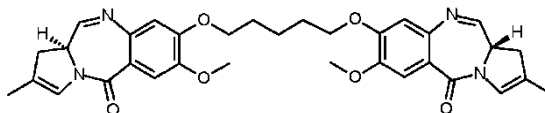
Las cohortes de cinco ratones receptores se trasplantan con 2000, 500, 120 o 30 células humanas vivas clasificadas procedentes de tumores tratados con conjugados de DLL3. Para una comparación, las cohortes de cinco ratones receptores se trasplantan con 1000, 250, 60 o 15 células humanas vivas clasificadas procedentes de tumores tratados con el control de isotipo del conjugado respectivo. Los tumores en los ratones receptores se miden semanalmente y los ratones individuales se someten a eutanasia antes de que los tumores alcancen los 1500 mm³. Después de la aparición del crecimiento del tumor, el estudio finaliza al cabo de cuatro semanas consecutivas sin que aparezca un nuevo tumor en ningún ratón adicional. En ese momento, los ratones receptores se puntúan como positivos o negativos para el crecimiento del tumor, teniendo un crecimiento positivo con volúmenes que superan los 100 mm³. Se espera que los receptores de células LU95 o KDY66 tratados con conjugados de DLL3 produzcan menos tumores, en comparación con los receptores de células LU95 o KDY66 tratados con el control de isotipo DL2.

Usando estadísticas de distribución de Poisson (programa informático L-Calcul, Stemcell Technologies), se utilizan dosis de células inyectadas de receptores con y sin tumores, 18 semanas después del trasplante para calcular las

5 frecuencias de células iniciadoras de tumores en cada población. Se espera que la cantidad de TIC por 10.000 células humanas vivas en muestras de LU95 o KDY66 se reduzca significativamente en los animales tratados con conjugados de DLL3, por ejemplo, al menos aproximadamente una reducción de 10 veces, o una reducción de 20 veces, o una reducción de 50 veces, o una reducción de 100 veces. La reducción sustancial de la frecuencia de células madre del cáncer sugeriría que los moduladores de la presente descripción pueden reducir de manera significativa y específica las poblaciones de células madre del cáncer y, por extensión, la recidiva, la metástasis o los tumores con un nuevo crecimiento potencial.

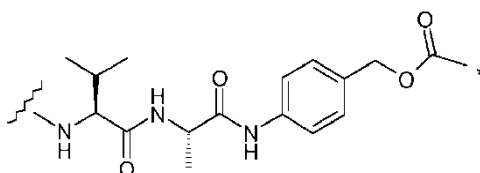
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) que comprende un agente de unión celular a DLL3 unido covalentemente por medio de un enlazador a una pirrolobenzodiazepina (PBD), en donde el agente de unión celular a DLL3 es un anticuerpo anti-DLL3, y en donde la PBD es:

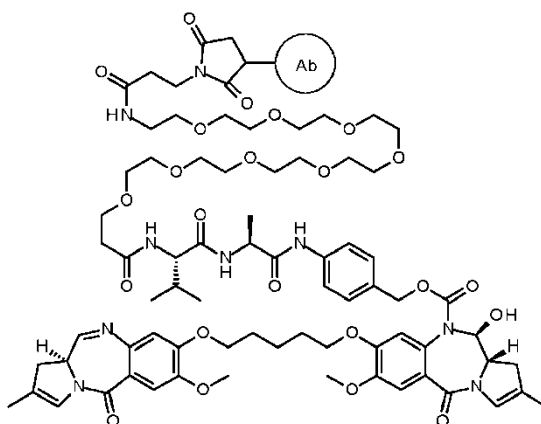


PBD 5

- 5
2. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 1, en el que el enlazador comprende un enlazador escindible.
3. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 2, en el que el enlazador escindible comprende un enlazador peptídico que comprende al menos dos aminoácidos.
- 10
4. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 3, en el que el enlazador peptídico comprende un dipéptido de valina-alanina.
5. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la estructura:



- 15
- en donde el asterisco indica el punto de fijación a la PBD, y en donde la línea ondulada indica el punto de fijación a la porción restante del enlazador.
6. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el enlace entre el anticuerpo anti-DLL3 y el enlazador se forma por reacción con un grupo maleimida del enlazador.
7. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ADC tiene una carga de fármaco de 2.
- 20
8. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que de 1 a 8 PBDs se fijan covalentemente al anticuerpo anti-DLL3.
9. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 1, en donde el conjugado de anticuerpo y fármaco es ADC5:



ADC 5

- 25
- en donde Ab comprende el anticuerpo anti-DLL3.
10. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 1, en donde el ADC es ADC5 y en donde el ADC

tiene una carga de fármaco de 2.

11. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 1, en donde el ADC es ADC5 y en donde de 1 a 8 PBDs se fijan covalentemente al Ab.

5 12. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo anti-DLL3 se selecciona a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDRs, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo multivalente, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv y un fragmento ScFv; o un fragmento inmunorreactivo de los mismos.

10 13. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el anticuerpo anti-DLL3 se une específicamente a un epítipo dentro del dominio DSL de una proteína DLL3 indicada en SEQ ID NO: 1 o 2.

14. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo anti-DLL3 se une específicamente a un epítipo que comprende los aminoácidos G203, R205 y P206 (SEQ ID NO: 4).

15 15. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el ADC es ADC5 y el anticuerpo anti-DLL3 comprende o compite por la unión a una proteína DLL3 humana con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera indicada como SEQ ID NO: 149 y una región variable de cadena pesada indicada como SEQ ID NO: 151.

20 16. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo anti-DLL3 comprende tres CDRs de una región variable de cadena ligera indicada como SEQ ID NO: 149 y tres CDRs de una región variable de cadena pesada indicada como SEQ ID NO: 151.

25 17. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo anti-DLL3 comprende los residuos 24-34 de SEQ ID NO: 149 para CDR-L1, los residuos 50-56 de SEQ ID NO: 149 para CDR-L2, los residuos 89-97 de SEQ ID NO: 149 para CDR-L3, los residuos 31-35 de SEQ ID NO: 151 para CDR-H1, los residuos 50-65 de SEQ ID NO: 151 para CDR-H2 y los residuos 95-102 de SEQ ID NO: 151 para CDR-H3, en donde los residuos están numerados de acuerdo con Kabat.

18. El conjugado de anticuerpo y fármaco según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo anti-DLL3 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos indicada como SEQ ID NO: 405 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos indicada como SEQ ID NO: 407.

30 19. Una composición farmacéutica que comprende (a) el conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. La composición farmacéutica según la reivindicación 19, que comprende una proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 cada una con +/- 0,4.

21. La composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende una DAR de 2 +/- 0,4.

35 22. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, que comprende menos del 30% de especies de ADCs no predominantes.

23. Un kit que comprende (a) uno o varios envases que contienen el conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18; y (b) una etiqueta o un prospecto en o asociado con uno o varios envases, en donde la etiqueta o el prospecto indica que el conjugado de anticuerpo y fármaco es para tratar el cáncer.

40 24. Un kit que comprende (a) uno o varios envases que contienen la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22; y (b) una etiqueta o un prospecto en o asociado con uno o varios envases, en donde la etiqueta o el prospecto indica que el conjugado de anticuerpo y fármaco es para tratar el cáncer.

45 25. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

26. El conjugado de anticuerpo y fármaco o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 25, en donde el cáncer comprende cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de tiroides o carcinoma neuroendocrino de células grandes.

50 27. El conjugado de anticuerpo y fármaco o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 25, en donde el cáncer comprende cáncer de pulmón de células pequeñas.

28. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la composición

farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, para uso en la reducción de la frecuencia de células iniciadoras de tumores en un sujeto.

5 29. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, para uso en la administración de la PBD a una célula cancerosa.

30. El conjugado de anticuerpo y fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, para uso en una terapia.

Alineación de dos isoformas de DLL3 humana (NP_058637 = var 1; NP_928353 = var 2)

NP_058637	(1)	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVVCLKPLGLSEEAASEPCALG	80
NP_982353	(1)	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVVCLKPLGLSEEAASEPCALG	
NP_058637	(81)	AALSARGPVYTEQPGAPAPDLPDPGLLQVPPFRDAMPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWAR	160
NP_982353	(81)	AALSARGPVYTEQPGAPAPDLPDPGLLQVPPFRDAMPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWAR	
NP_058637	(161)	DIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSEPHGFCEQPGECRCL	240
NP_982353	(161)	DIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRGGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSEPHGFCEQPGECRCL	
NP_058637	(241)	EGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGP	320
NP_982353	(241)	EGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGP	
NP_058637	(321)	CFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRAC	400
NP_982353	(321)	CFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRAC	
NP_058637	(401)	ANGGTCVEGGGHRCSALGFGGRDCREPADPCAARPCAAGGRCYAHFSLVACAPGYMGARCEFFVHPD GASALPAAP	480
NP_982353	(401)	ANGGTCVEGGGHRCSALGFGGRDCREPADPCAARPCAAGGRCYAHFSLVACAPGYMGARCEFFVHPD GASALPAAP	
NP_058637	(481)	PGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAAALLLVHVVRRRHGSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSS	560
NP_982353	(481)	PGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAAALLLVHVVRRRHGSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSS	
NP_058637	(561)	VDWNRPEVDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK	618
NP_982353	(561)	VDWNRPEVDVDPQGIYVISAPSIYAREA-----	

FIG. 1

Representación esquemática de la proteína DLL3

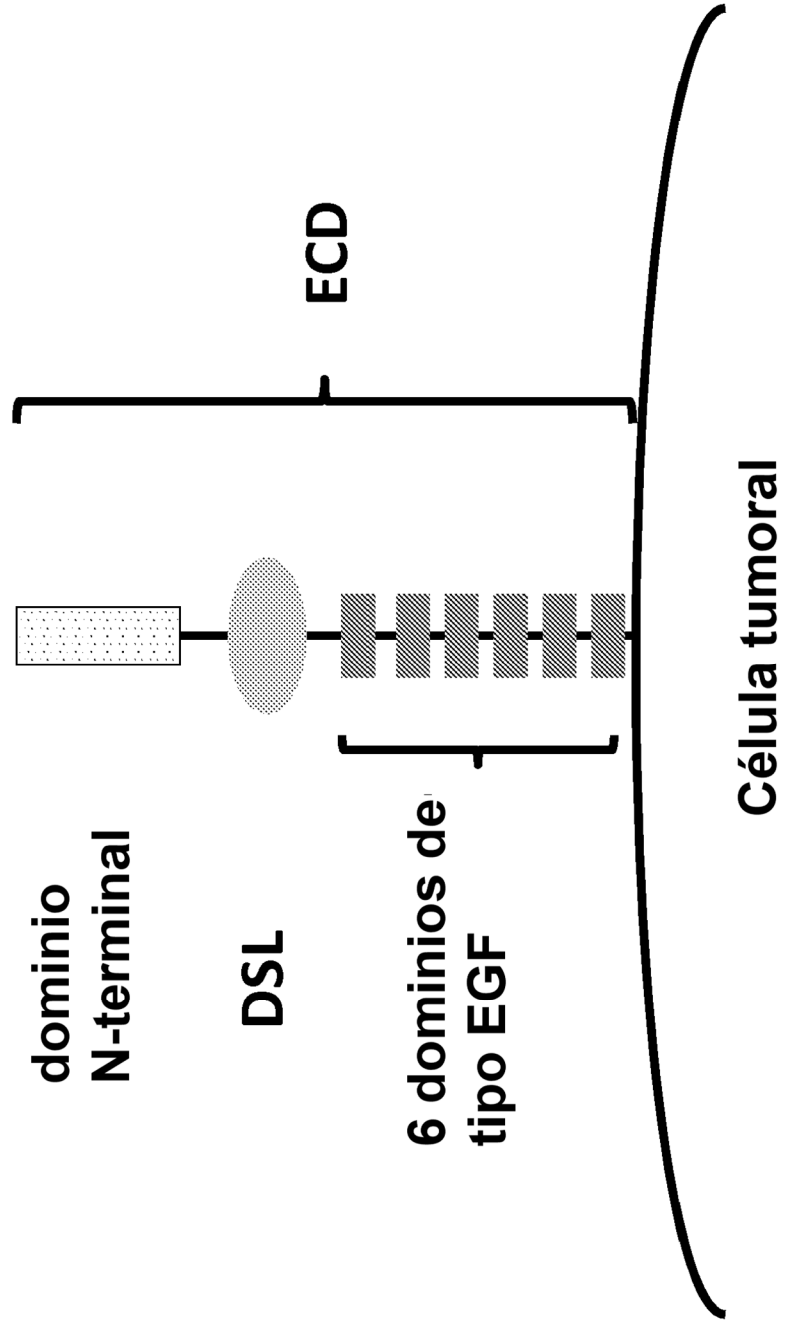


FIG. 2

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ.ID NO.
SC16.3	QIVLTQSPAIMSVSLGERVTMTCC	TASSVSSVSLH	WYQQKPGSSPKLWIY	STSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYFFITSSMEAEADAATYYC	HQVHRSPFT	FGAGTKLEIKR	21
SC16.4	DIQMTQTTSSLSASIGDRVTISCC	RASQDIINVLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPARFSGSGGTSDYSLTISNLELEDIATYFC	QQGDMLPWT	FGGKTKLEIK	25
SC16.5	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCC	SASSVSVYMH	WYQQKSGTSPKRWIY	DTSKLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	QQWTRNPLT	FGAGTKLEIK	29
SC16.7	NIMMTQSPSSIAVSAGEKVTMISCC	KSSQSILSDSDGKTYLN	WYQQKPGGSPKLLIY	WASTRES	GVPDRFTSGSGGDTFTLTISTVQVEDLAVYYC	HQVLSWWT	FGGKTKLEIK	33
SC16.8	EIQMTQSPSSMSASLIGDRITITCC	QATQDVKNLN	WYQQKPKPPSEFLIY	YAIELAE	GVPARFSGSGGSDYSLTISNLESEDFADYYC	LQFYEPFT	FGAGTKLEIK	37
SC16.10	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCC	TASSVSSVSLH	WYQQKPGSSPKLWIY	STSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	HQVHRSPFT	FGGKTKLEIK	41
SC16.11	DVEMTQTPTLTISVIGQPASISCC	KSSQSILSDSDGKTYLN	WYQQKPGGSPKRLIY	LVSKLDS	GVPDRFTSGSGGDTFTLTKISRVEAEDLGVYYC	WQGRKHPWT	FGGKTKLEIK	45
SC16.13	QIVLTQSPALVSAASPGKVTMTCC	SASSVSVYMY	WYQQKPRSSPKRWIY	LTSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	QQWRSNPFT	FGGKTKLEIK	49
SC16.15	DIQMTQSPASLAASVGETVAITCC	RASENIYNYLA	WYQQKQKSPQLLIY	TANSLD	GVPARFSGSGGTQSLKINSMQPEDSATYFC	KQAYDVPTT	FGGKTKLEIK	53
SC16.18	DIQMTQTTSSLSASIGDRVTISCC	RASQNIINVLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPARFSGSGGTSTYSLTISNLELEDIATYFC	QQYSERPYT	FGGKTKLEIK	57
SC16.19	DIQMTQSPSSLSASIGGKVTFTCC	KASQDIHKYVA	WYQHKPKGPRLLIH	YTSILQD	GISSRFSGSGGSDYSLTISNLELEDIATYFC	LQVNNLYT	FGGKTKLEIK	61
SC16.20	EIQMTQSPSSMSASLIGDRITITCC	QATQDVKNLN	WYQQKPKPPSEFLIY	YATELAE	GVPARFSGSGGSDYSLTIRNLESEDFADHYC	LQFYEPFT	FGAGTKLEIK	65
SC16.21	DIVMTQSPSSLAIVSQKVTMISCC	KSSQSILSDSDGKTYLN	WYQQKPGGSPKLLVS	FASTRES	GVPDRFTSGSGGDTFTLTISGQVQAEADLAVYYC	QQHYSIPLT	FGAGTKLEIK	69
SC16.22	DIQMTQTTSSLSASIGDRVTISCC	RASQDIINVLN	WYQQKPDGTVKPLIY	YTSRVHS	GVPARFSGSGGTSTYSLTISNLELEDIATYFC	QQGTLPFT	FGGKTKLEIK	73
SC16.23	QIVLTQSPAIMSASPGKVTLTC	SASSVSVRYLY	WYQQKPGSSPKLWIY	STSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLIUSMEAEADAATYYC	HQWSNYPLT	FGAGTKLEIK	77
SC16.25	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCC	SASSVSVYMH	WYQQKSGTSPKRWIY	DSKLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	QQWSSNPLT	FGAGTKLEIK	81
SC16.26	DVEMTQTPTLTISVIGQPASISCC	KSSQSILSDSDGKTYLN	WYQQKPGGSPKRLIY	LVSKLDS	GVPDRFTSGSGGDTFTLTKISRVEAEDLGVYYC	WQGRKHPWT	FGGKTKLEIK	85
SC16.29	QIVLTQSPAIMSASPGKVTITCC	SASSVSVYMH	WYQQKGTSPKRWIY	TTSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	QQRSIYPYT	FGGKTKLEIK	89
SC16.30	QIVLTQSPPTIMASLGERVTMTCC	TASSVTSVSLH	WYQQKPGSSPKLWIY	STSNLAS	GVPARFSGSGGTSTYSLTSSMEAEADAATYYC	HQVHRSPFT	FGGKTKLEIK	93
SC16.31	DIVLTQSPLELPLVNIIGDQASISCC	KSTKSLINDSGFTYLD	WYLRQPGGSPQLIY	LVSNRFS	GVPDRFTSGSGGDTFTLTKISRVEAEDLGVYYC	FQSNVLPIT	FGAGTKLEIKR	97

FIG. 3A

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC1.6.34	SIVMTQTPKFKLLVSAQDRVTITC	KASQSVSNDVA	WYQQKPGQSPKLLY	YASNRYS	GVPRFRFGSGGDTFTTISVQAEALAVFC	QQDYSSPWT	FGGGTKLEIK	101
SC1.6.35	DIQMTQTTSSLSASLIGDRVTISC	RASQDINSYLN	WYQQKPGDGVKLLY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGGTVDVSLTISNLEGEDEIATFC	QQGNTLPT	FGGGTKLEIK	105
SC1.6.36	ETTVTQSPASISVTTGKVTIRC	ITTPDIDDDMM	WYQQKPGEPNLLS	EGNSLRP	GVPSRFSSSGYGTINFTVFTIENTLSEDAVADYVC	LOSDMNPFT	FGSGTKLEIK	109
SC1.6.38	QIVLTQSPAIMSASPGKVTITC	SASSSINVMH	WYQQKPGTSPKRWY	DTSKLAS	GVPARFSGSGSTYSVLTSSVMEAEADAATYVC	HQRSTWT	FGGGTKLEIK	113
SC1.6.41	DIQMTQTTSSLSASLIGDRVTISC	RASQDINSYLN	WYQQKPGDGVKLLY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGRTDVSILTISNLEFEDIATYVC	QQYSERPYT	FGGGTKLEIK	117
SC1.6.42	DVIMTQSPISLSVSGDOASISC	RSSQNVHSDRYTLE	WYLOKPGQSPKLLY	GVSNRFS	GVPRFRFGSGSGDTFTLMSRVEAEDMGVYVC	FOGTHVPYT	FGGGTKLEIK	121
SC1.6.45	EIQMTQSPSSMSASLIGDRITTC	QATQDIVKNLN	WYQQKPGKPPFLY	YATELAE	GVPARFSGSGSDVSLTISNLESEDFADYHC	LOFYEPFT	FGAGTKLEIK	125
SC1.6.47	DVILTQSPISLPVINGDOASISC	KSTSLNSDGFVLD	WYLRPQSPQFLY	LVSNRFS	GVPRFRFGSGSGTDFTLKSRVEAEDLGVYVC	FQSNVPLT	FGAGTKLEIR	129
SC1.6.49	DIKMTQSPSSMYASLIGERVITTC	KASQDINSVLS	WFOQKPGKSPKTLY	RANRLVD	GVPSRFSGSGSQDVSILTISLEYEDMGVYVC	LOYDEPPLT	FGAGTKLEIK	133
SC1.6.50	DIQMTQTTSSLSASLIGDRVTISC	RASQDINSYLN	WYQQKPGDGVKLLY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGGTVDVSLTISNLEGEDEIATFC	QQGNTLRT	FGGGTKLEIK	137
SC1.6.52	DIQMIQSPSSMFASLIGDRVSLSC	RASQGIKGLD	WYQQKPNGTKLLY	STSNLNS	GVPSRFSGSGSDVSLTSSLESEDFADYVC	LQRNAYPLT	FGAGTKLEIK	141
SC1.6.55	DIKMTQSPSSMYASLIGERVITTC	KASQDINSYLN	WFOQKPGKSPKTLY	RANRLVD	GVPSRFSGSGSQDVSILTISLEYEDMGVYVC	LOYDEPPT	FGGGTKLEIK	145
SC1.6.56	SIVMTQTPKFKLLVSAQDRVTITC	KASQSVSNDVV	WYQQKPGQSPKLLY	YASNRYT	GVPRFRFGSGYGTDFSTFTISVQAEALAVFC	QQDYTSPWT	FGGGTKLEIR	149
SC1.6.57	DIVMTQSHKFMISVIGDRV5ITC	KASQDV5IFVA	WYQQKPGQSPKLLY	S4SYRYT	GVPRFRFGSGGTDFRFTISSVQAEALAVYVC	QQHVTFFT	FG5GTKLKR	153
SC1.6.58	DIQMTQSPASLSSVIGETVITTC	RASENIYSYLA	WYQQKQKSPQLLY	NAKTLAE	GVPSRFSGSGGTQFSLKINSILOPEDFGETYVC	QHHYDSPLT	FGAGTKLEIR	157
SC1.6.61	DIVMTQSTSSLAMV5GQKVTM5C	KSSQSLNS5NQKNYLA	WYQQEPPQSPKLLVS	FASTRES	GVPRFRFGSGGTDFLTSIGVQAEALAVYVC	QQHYSIPLT	FGAGTKLEIK	161
SC1.6.62	DIKMTQSPSSMYASLIGERVITTC	KASQDINSFLS	WFOQRKPSKPKTLY	RANRLVD	GVPSRFSGSGQEFLTSSLEYEDLGYVC	LOYDEPPT	FGGGTKLEIK	165
SC1.6.63	QIVLTQSPAIMSASPGKVTITC	SASSSINVMY	WYQQKSGTSPKRWY	DTSKLAS	GVPARFSGSGSTYSVLTSSVMEAEADAATYVC	QQWSSNPVT	FGGGTKLEIK	169
SC1.6.65	QIVLTQSPALLMSASPGKVTITC	SVTSSVSNMY	WYQQKRPSSPKRWY	LTSNLAS	GVPARFSGSGSTYSVLTSSVVEAEDAATYVC	QQWRNMPFT	FGSGTKVEIK	173
SC1.6.67	QAVVTOESALLTSPGETVILTC	RSSTGAVTTSNVAN	WIQEQLHLFTGLIG	GTNNRAP	GVPARFSGSLGKAAALITTTGAQTEDEAVFC	GLWYSNHLV	FGGGTKLTVL	177
SC1.6.68	ETTVTQSPAFISVATGKVTIRC	ITSTDIDDDMM	WYQQKPGEPNLLS	EGNTLRP	GVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDAVADYVC	LOSDMNPILT	FGAGTKLEIK	181
SC1.6.72	ENVLTQSPAIMSASLIGKVTM5C	RASSSINVM5S	WYQQKQDASPKLWY	YTSNUAP	GVPARFSGSGSNYSVLTSSVMEGEADAATYVC	QQFTSSPPT	FGGGTKLEIK	185

FIG. 3A cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.73	DIQMTQSPSSLASLGERVSLTC	RASQDIGVSLN	WQQQIPDGTKRIIY	ATSSLS	GVPFRFSGSGSDYSLTSSLESDRVDYVC	LQYASSPWT	FGGGTKLEIK	189
SC16.78	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC	KASQDINSYLS	WYQQKPGSPKTLIY	RANRLVD	GVPFRFSGSGGQDYSLTSSLDYEDMGIVYC	LQYDEFPPT	FGSGTKLEIK	193
SC16.79	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTM5C	KSSQSLNRSRTRKNVLA	WYQQKPGSQPKLLIY	WASTRES	GVPDRFTGSGSGTDFLTSSVQAEADLAVYVC	KQSYNLYT	FGSGTKLIK	197
SC16.80	ETTVTQSPASLSMAGEKVTIRC	ITSTDIDDDMI	WYQQKPGEPKLLIS	EGNLRP	GVPFRFSSGVGTDVFVTIENMLSEVDVADYVC	LKRDDLPT	FGGQTQVEIK	201
SC16.81	QIVLTQSPAIMSASLGERVTLTC	TASSVSSSYLH	WYQQKPGSSPKLIY	STSNLAS	GVPTRFSGSGSTSYSLRISSMFEADAATYVC	HQYWRSPLT	FGAGTKLEIK	205
SC16.84	DIQMTQSPSSLASLGGKVTITC	KASQDIKKYIA	WYQHKPGKPRLLIH	YSTLEP	GVPFRFSGSGGRDYSEFSINLEPEDIAITYC	LQYDILLWT	FGGGTKLEIK	209
SC16.88	ENVLTQSPAIMAASLGGKVTMTC	SASSVSSSYLH	WYQQKGSAPKPIH	RTSNLAS	GVPARFSGSGSTSYSLTSSVEAEDAATYVC	RQW5GYPWT	FGGGTKLEIK	213
SC16.101	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTC	TASSVSSSYLH	WYQQKPGSSPKLIY	STSNLAS	GVPARFSGESGTSYSLTINMEADAATYVC	HQYHRSPFT	FGSGTKLEIK	217
SC16.103	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	RASKVSTSGVSMH	WYQQKPGQPKLLIY	LASNLES	GVPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEDAATYVC	QHSHRELPLT	FGAGTKLEIK	221
SC16.104	QIVLSQSPAILSASPGKVTMTC	RASSVSYIHH	WYQQKPGSSPKPIY	ATSNLAS	GVPARFSGSGSTSYSLTISRVEAEDAATYVC	QQWSSNPPT	FGAGTKLEIK	225
SC16.105	DIVMTQSHKFMSTSGDRV5ITC	KASQDVGTAVA	WYQQKPGSQPKLLIY	WASIRHT	GVPDRFTGSGSGTDFLTSSNVQSEDLADVFC	QQYSSVPLT	FGAGTKLEIK	229
SC16.106	DIKMTQSPSSMYASLGERVITTC	KASQDINSYLS	WYQQKPGKSPKTLIY	RANRLVD	GVPFRFSGSGGQDYSLTSSLEVEDMGIVYC	LQYDEFPPT	FGSGTKLEIK	233
SC16.107	DIVMTQSHKFMSTSGDRV5ITC	KASQDVNTAVG	WYQQKPGSQPKLLIY	SASRYT	GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEADLAVYVC	QQHSSPPT	FGGGTKVEIK	237
SC16.108	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RASENIYSYLA	WYQQKQKSPQLLIY	NAKTLAE	GVPFRFSGRSQSFLKINSIQPEDFGSYVC	QHHYGTPT	FGGGTKLEIK	241
SC16.109	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTC	SASSVSMYI	WYQQKPGSSPRLIY	DTSNLAS	GVPFRFSGSGSTSYSLTISRMEADAATYVC	QEW5GNPLT	FGDGTKLEIK	245
SC16.110	NIWMTQTPKFLVSAADRVTITC	KASQSVNDVA	WYQQKPGSQPKLLIY	YASNRYT	GVPDRFTGSGYTDFTFTISTVQAEADLAVYVC	QQDYSSPPT	FGGGTKLEIK	249
SC16.111	DIQMTQSPASLAASVGETVTITC	RASENIYSYLA	WYQQKQKSPQLLIY	NANSLD	GVPFRFSGSGGTCQVSMKINSIQPEDTATYFC	KQTYDVPILT	FGAGTKLEIK	253
SC16.113	DVWMTQTPILTSVITIGQPASISC	KSSQSLDSDGTTYLN	WILLQRPQSPKRIIY	LVSKLDS	GVPDRFTGSGSGTDFLTKISRVEAEDLGVYVC	WQGTHFFPLT	FGAGTKLEIK	257
SC16.114	QIVLSQSPAILSASPGKVTMTC	RASSVSMYIHH	WYQQKPGSSPKPIY	ATSNLAS	GVPARFSGSGSTSYSLTISRVEAEDAATYVC	QQWSSNPPT	FGGGTKLEIK	261
SC16.115	DVWMTQTPILTSVITIGQPASISC	KSSQSLDSDGTTYLN	WILLQRPQSPKRIIY	LVSKLDS	GVPDRFTGSGSGTDFLTKISRVEAEDLGVYVC	WQGTHFFPLT	FGAGTKLEIK	265

FIG. 3A cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.116	DIVMTQSPSSLYTAGEKVTMSC	TSSQSLTSGNQKQNLIT	WYQOKPGQPKLLIY	WASTRES	GVPRFTGSGSGDTFTLTISSLQAECLAAYYC	QINDYSLT	FGAGTKLEIK	269
SC16.117	DIQMNQSPSSLSASLGDITITTC	HVSNQINWVLS	WYQOKPGNPKLIQ	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISSLOPEDAATYYC	QQGQSYPT	FGSGTKLEIK	273
SC16.118	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	KASQSYVDGDSYLT	WYQOKPGQPKLLIY	AASNLES	GIPARFSGSGSGTFTLNIHPVEEEDAATYYC	QQSNEDPYT	FGGGTKLEIK	277
SC16.120	DIVMSQSPSSLAVSVEKVTMSC	KSSQSLYSSTQKNVLA	WYQOKPGQSPKLIY	WASTRES	GVPRFTGSGSGDTFTLTISSVKAEDLAAYYC	QQYYSYPYT	FGGGTKLEIK	281
SC16.121	QIVLTQSPAIMSASPGKVTITC	SASSVSYMH	WFQOKPGTSPKLIWY	STSNLAS	GVPARFSGSGSGTYSLSITSRMEAEAAATYYC	QQRSYSPPT	FGGGTKLEIK	285
SC16.122	DIVMTQSPKFMSTVGDVRSVTC	KASQINVTNVA	WYQOKPGQSPKLIY	SASVRSY	GVPRFTGSGSGDTFTLTISSVQSEDLAEFFC	QQYNSYPLT	FGGGTKLEIK	289
SC16.123	QIVLTQSPAIMSASLGERVTITC	TASSVSSSYLH	WYQOKPSSPKLIWY	STSNLAS	GVPARFSGSGSGTYSLSITSSMETEDAATYYC	HQVHRSPPFT	FGSGTKLEIK	293
SC16.124	DIQMTQSPASQASLIGESVITTC	LASQTIGTWLA	WYQOKPGKSPQLLIS	AAATSLAD	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAEAFVSYC	QQLYSTPWY	FGGGTKLEIK	297
SC16.125	DIQMNQSPSSLSASLGDITITTC	HASQINWVLS	WYQOKPGNPKLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISSLOPEDAATYYC	QQGQSYPT	FGGGTKLEIK	301
SC16.126	DIQMNQSPSSLSASLGDITITTC	HASQINWVLS	WYQOKPGNPKLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISSLOPEDAATYYC	QQGQSYPT	FGSGTKLEIK	305
SC16.129	DIQMTQSPAQSASLIGESVITTC	LASQTIGTWLA	WYQOKPGKSPQLIY	AAATSLAD	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAEAFVSYC	QQLYSTPYT	FGGGTKLEIK	309
SC16.130	DIQLTQSPASLSASVGETVITTC	RAQSGIHNYLA	WYQOKGKSPQLIY	NAKTLVD	GVPSRFSGSGSGTQVSLKINSIQLPEDFGYC	QHFWTTPWY	FGGGTKLEIK	313
SC16.131	DIQMNQSPSSLSASLGDITITTC	HVSNQINWVLS	WYQOKPGNPKLIQ	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISSLOPEDAATYYC	QQGQSYPT	FGSGTKLEIK	317
SC16.132	DIQMTQSPAQSASLIGESVITTC	LASQTIGTWLA	WYQOKPGKSPQLIY	AAATSLAD	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAEAFVSYC	QQLYSTPWY	FGGGTKLEIK	321
SC16.133	SIWMTQTPKFLVLSAGDRVTITC	KASQSYNDVA	WYQOKPGQSPKLIY	CASNRYT	GVPRFTGSGYGTDFTTISVQAECLAAYFC	QQDYSSPLT	FGAGTKLEIK	325
SC16.134	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	KASQVDHAGDSYMN	WYQOKPGQSPKLIY	AASNLES	GIPARFSGSGSGTFTLNIHPVEEEDAATYYC	QQSNEDPYT	FGGGTKLEIK	329
SC16.135	DIKMTQSPSMYASLGERVTITC	KASQDINRYLS	WFQOKPGKSPKTIY	RANRLVD	GVPSRFSGSGSGDQVSLTISSLEYEDMGIYYC	LQVDEPFT	FGSGTKLEIK	333
SC16.136	DIQMTQSPASLSASVGETVITTC	RAQSNHNYLA	WYQOKGKSPHLLIY	NAKTLAD	GVPSRFSGSGSGTQVSLKINSIQLPEDFGSYYC	QHFWSTPWY	FGGGTKLEIK	337
SC16.137	QIVLTQSPAIMSASLIGEEITTC	SASSVSYMH	WYQOKSGTSPKLIY	STSNLAS	GVPSRFSGSGSGTFTLTISSVKAEDAAYYC	HQWSSVHT	FGGGTKLEIK	341

FIG. 3A cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.138	DIQMTQSPASQASLIGESVITTC	LASQITGTWLA	WYQCKPGKSPQLLIY	SATSLAD	GVPSRFSGSGGTFRFKSISSLAQEDFVSYIC	QLLYSTPWT	FGGGTKLEIK	345
SC16.139	DIVMTQSHKFMSTVGDRTVITC	KASQDVNTAVG	WYQCKPGQSPKLLIY	SASYRIT	GVPRFRFGSGSGTDFFTTSSVQAEDLAWYYC	QQHYSSPYT	FGGGTKLEIK	349
SC16.140	DIVLTQSLASLAVSLGQRATISC	RASKSVSTSGSYVMH	WYQCKPGQSPKLLIY	LASNLES	GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEDEDAATYYC	QHSRELPFT	FGGGTKLEIK	353
SC16.141	DIKMTQSPFSIMYASLIGERVITTC	KASQDINSYLS	WFQCKPGKSPKTLIY	RANRLVD	GVPSRFSGSGSGGQDYSLTISLEYEDMGIYYC	LQYDEFPFT	FGSGTKLEIK	357
SC16.142	DIKMTQSPFSIMYASLIGERVITTC	KASQDINNYS	WFQCKPGKSPKTLIY	RANRLVD	GVPSRFSGSGSGGQDYSLTISLEYEDMGIYYC	LQYDEFPYT	FGGGTKLEIK	361
SC16.143	DVLMTQTPLSPVSLGDAQSISC	RSSQSIWHSENGNTYLE	WYLOKPGQSPKLLIY	KVSNRF5	GVPRFRFGSGSGTDFTLKISRVAEADLGWYYC	FGGSHVPLT	FGAGTKLEIK	365
SC16.144	SIVMTQTTPKFLNSAGDRVTITC	KASQSV5NDVG	WYQCKPGQSPKLLIY	YASNRYN	GVPRFRFGSGYGTDFFTTSTVQAEDLAWYFC	QQDYSSPWT	FGGGTKLEIK	369
SC16.147	DIQMTQTASLSASLIGDRVTISC	RASQDINNLYN	WYQCKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISILEQEDATYFC	QQGDTLPWT	FGGGTKLEIK	373
SC16.148	QIVLTQSPAIMASAPGKVTITTC	SASSSV5VMY	WYQCKFGSSPRLIY	DTSNLAS	GVVRFSGSGSGTSYSLTSRMEADTATYYC	QEW5NNPLT	FGDGTKLEIK	377
SC16.149	DIQMNQSPSSLASLIGDITITTC	HASQNNWLLS	WYQCKFGNPKLLIY	KASHLHT	GVPSRLSGSGSGTGFLLTSSLPQEDATYYC	QQGQSPFT	FGSGTTLLEIK	381
SC16.150	DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTM5C	MISSQLLYSSTQKNYLA	WYQCKPGQSPKLLIY	WASTRES	GVPRFRFGSGSGTDFTLTSSVKAEDLAWYYC	QQY5YPYT	FGGGTKLEIK	385

FIG. 3A cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-DLL3 humanizado ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ. ID NO.
hSc16.13	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	SASSSVSMY	WYQQKPGKAPKLLIY	LTSNLA	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISIQPEDFATYYC	QQWRSNPFT	FGGGTKLEIK	389
hSc16.15	AIQLTQSPSSLSASVGRVTITC	RASENIYNLA	WYQQKPGKAPKLLIY	TANSLED	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISIQPEDFATYFC	KQAYDVPPT	FGGGTKLEIK	393
hSc16.25	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC	SASSSVSMH	WYQQKPDQSPKLLIK	DSSKLA	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEADAATYYC	QQWSSNPLT	FGGGTKLEIK	397
hSc16.34	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KASQSVNDVA	WYQQKPGKVPKLLIY	YASNRYS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISIQPEDVATYFC	QQDYSPWIT	FGGGTKVEIK	401
hSc16.56	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	KASQSVNDVV	WYQQKPGQAPRLIY	YASNRYT	GIPARFSGSGGTEFTLTISIQSEDFAVYYC	QQDYTPWIT	FGGGTKLEIK	405

FIG. 3A cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.3	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	HIWDDVRRNPAKLS	RLTISKDTSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	IADYGGDYAMDY	WGQGTSTVTVSS	23
SC16.4	QIQLVQSGPELTKPGETVWISKCKASGYFTT	DYSMH	WVKQAPGKGLKWMWG	WINTETGEPVADDFKGG	RFAFSLTSASTAFILQINMLENEDTATYFCAR	YGGIAMDY	WGQGTSTVTVSS	27
SC16.5	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	DHWDDNRYNPSLKS	RLTISKDTSSQVFLKITSVDTADTATYYCAR	RVNYVDPPYAMDY	WGQGTSTVTVSS	31
SC16.7	EVQLQQSGPELVKPGASVWISKCKASGYSTF	GYRKH	WVKQSHVYSLEWIG	RINPYNGATSYNQNFKD	KATLTVDKSSSTAINMDLHLSLTSSEDSAVYFCAR	GDYRWDWFAY	WGQGLTVTVSA	35
SC16.8	QAQLQQSGAEELVPRGTSVWCKVAGYAFT	NYLIE	WVKQRPGQGLEWIG	VINPCTGGTINVENFKG	KATLTADKSSSTAINMQLSSLTSDSDSAVYFCAR	SPYDHEGAMDY	WGQGTSTVTVSS	39
SC16.10	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	HIWDDVRRNPAKLS	RLTISKDTSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	LVDDLTYFDY	WGCGTTLTVSS	43
SC16.11	QIQLVQSGPELTKPGETVWISKCKASGYFTT	DYSMH	WVKQAPGKGLKWMWG	WINTETVEPTVADDFMG	RFAFSLTSASTAFILQINMLENEDTATYFCAR	FGSIAMDY	WGQGTSTVTVSS	47
SC16.13	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	HIWDDVRRNPAKLS	RLTISKDTSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	IVSFQNDVSAAMDY	WGQGTSTVTVSS	51
SC16.15	QVQLQQSGAEELVPRGASVWISKCKASGYFTT	RYWIH	WVKRPPGQGLEWIG	YINPTVYTFEINQFKD	KATLTADKSSSTAINMQLSSLTSDSDSAVYFCAR	GGSNFFDY	WGCGTTLTVSS	55
SC16.18	EYKLESGGGLVQPGESMKLSCASGFTFS	DAWMD	WVVRSPFKLEWVA	EIRKANNHATYYAESVKG	KFTISRDDSKSRVYLQMINLRAADTGYICTA	YSNFAY	WGQGLTVTVST	59
SC16.19	EVQLQQSGAEELVPRGASVWISKCKASGYFTT	DSLH	WVKQRPEKLEWIG	WIDPEGETKYAPNFD	KATITTDSSSNATYLOLISLTSVDATYYCAY	GNVYRHFYD	WGCGTTLTVSS	63
SC16.20	QVQLQQSGTELVRPGETSIRVCKASGYAFG	NHLIE	WVKQRPGQGLEWIG	VINPCTGGTHYNEFKD	KARLTADKSSNATYWHLNSLTSDDSAVYFCAR	SPYDHEGAMDY	WGQGTSTVTVSS	67
SC16.21	QVQLQQSGPELVKPGASVWISKCKASGYAFS	SSWVN	WVKQRPGKLEWIG	RIVPQGDNTVINGKFKG	KATLTADKSSSTAINMQLSSLTSDSDSAVYFCAM	GINYDGSRYSMYD	WGQGTSTVTVSS	71
SC16.22	QVQLQQPGAEELVPRGASVWISKCKASGYFTT	TYWVH	WVKQRPGQGLEWIG	EIDFSDSYTYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAINMQLSSLTSDSDSAVYFCAR	GDYGNPYAMDY	WGQGSSTVTVSS	75
SC16.23	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSNTGIG	WIRQPSGKLEWLA	HIWDDNRYNPSLKS	RLTISKETSNNQVFLKITNVDTADTASVFCVQ	IGRDYSNVAWYFDV	WGAGTTVTVSS	79
SC16.25	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLT	DIWDDNRYNPSLKS	RLTISKDTSSQVFLNITSVDTADTATYYCAR	RVNYVDPPYAMDY	WGQGTSTVTVSS	83
SC16.26	QIQLVQSGPELTKPGETVWISKCKASGYSTF	DYSMH	WVKQAPGKGLKWMWG	WINTETVEPTVADDFMG	RFAFSLTSASTAFILQINMLENEDTATYFCAR	FGSIAMDY	WGQGTSTVTVSS	87
SC16.29	QVQLQQSGAEELVPRGASVWISKCKASGYFTT	DQVIN	WVKQRPGQGLEWIG	EIVPGRGTYNEKFKG	KATLTADKSSSTAINMQLSSLTSDSDSAVYFCAR	EDGGVDDAWFAY	WGQGLTVTVSA	91
SC16.30	QVTLKESGPIQLQPSQTLTSLTCSFSGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	HIWDDVRRNPAKLS	RLTISKDTSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	IVDGHPPFAY	WGQGLTVTVSA	95
SC16.31	EVQLQQSGPELVKPGASVWISKCKASGYSTF	RFYMH	WVKQSPENSEWIG	EINPSTGTSVYNGKFKG	KATLTVDKSSSTAINMQLSSLTSEESAVYYCTR	GYGSAWYFDV	WGAGTTVTVST	99

FIG. 3B

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	F1L	CDRL	F2	CDR2	F3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.34	QIQLVDSGPELKRPGETVKSCKASGYTF	NYGNM	WVKQAPGKGLKMWIG	WINTYTGDPYADDFKQ	RFAFSLTSASTAYLQINLNKINEDTATYFCAR	IGGNPSPDY	WGQGTSLTVSS	103
SC16.35	DVQLQESGPGLVWPSQSLSLCTVIGYSIT	SDYAWN	WIRQPGNKLEWIG	YISYSGSTYNPSLKS	RISITRDTSKNQFLQLNSVTTEDATYYCAR	FYGSYVAMDY	WGQGTSLTVSS	107
SC16.36	QVQLQDSGAEIAKPGASVYKMSCKASGYTF	TYWNIH	WVKQRPQGLEWIG	YINPSSGYTENQKFKD	KATLTADKSSSTAYMQLSSITSEDSYVYFCAR	KGSNRGFAY	WGQGTSLTVSS	111
SC16.38	EVQLQDSGAEIVKPGASVYKLSCTVSGFNK	DTYIH	WVKQRPQGLEWIG	RIDFANGNTWPKFQD	KATTTADTSSTAYLQLSLSLTDATVYYCAR	PTGVFEY	WGQGTSLTVSS	115
SC16.41	EVKLEESGGGLVQFGSGMKLSCAASGFTFS	DAWMD	WVROSPKGLWVA	EIRKANINHTYYPESVKG	RFTISRDDSKSRVYLOMNNLRAEDTGIYCTG	YSSFAY	WGQGTSLTVSA	119
SC16.42	QIQLVDSGPELKRPGETVKSCKASGYTF	TAGMIQ	WVQKMPGKGFKWIG	WINTHSGEPKADDFKQ	RFAFSLTSASTAYLQINLNKINEDTATFFCAP	LWSDSSFFAY	WGQGTSLTVSA	123
SC16.45	QVQLQDSGADIVRPGTSVYKLSCKASGYST	NYLIE	WVKQRPQGLEWIG	VINPSSGGTHYNEKFKD	IKAVLTADKSSITTAHMQLSLITSDSAAVYFCAR	SPDYNDGAMDY	WGQGTSLTVSS	127
SC16.47	EVQLQDSGPELKRPGASVYKISCKASQYSEF	RFYMIH	WVKQSPENLEWIG	EINPSTGTSYVQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSESAVYVCTR	GYGSNCYFDV	WGAGTSLTVST	131
SC16.49	QVQLQDSGPELKRPGTLYKISCKASGYTF	SYDIN	WVKQRPQGLEWIG	WYYPQDGNTRKSEKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLTSLTSESAVYFCAR	DYDYFFAY	WGQGTSLTVSA	135
SC16.50	EVQLVEGSGGLVQPGGVIKLSCAASGFTFS	SYAMS	WVROSPKRLWVA	EISIGGSYTYPDYTG	RFTISRDNKNTLYLEMSSLRSESDTAMYYCAR	EGYDYDVRAMDY	WGQGTSLTVSS	139
SC16.52	QVQLKESGPGLVAPSDLSITCAVSGFSLT	SFAIH	WFRKPPGKLEWIG	VIMTGGTNYNSALMS	RLSISKDMSKQVFLKVINSLQTDDTAVYYCAR	DDYDNNYAMDY	WGQGTSLTVSS	143
SC16.55	EVQLVEGSGGLVQPKGSLKLSCAVSAFTFT	TYAMN	WVROAPKGLWVA	RIRKSNMYAYYADSVKD	RFTISRDDSQSMLYQMINLKIETAMYYCVF	YYDYVY	WGQGTSLTVSA	147
SC16.56	QIQLVDSGPELKRPGETVKSCKASGYTF	NYGNM	WVKQAPGKGLWMA	WINTYTGEPYADDFKQ	RFAFSLTSASTASLQIINLNKINEDTATYFCAR	IGDSSPSDY	WGQGTSLTVSS	151
SC16.57	EVKLVESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFAF	SYDMS	WVROTPKRLWVA	TISGGSYTYYPDSVKG	RFTISRDNVDTLYLQMSLRSEDTALYYCAR	QAIQTYFDY	WGQGTSLTVSS	155
SC16.58	DVQLVEGSGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS	SFGWH	WVROAPKGLWVA	YISGSSNHYADTVKQ	RFTISRDNPKVTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR	GYGWDAMDY	WGQGTSLTVSS	159
SC16.61	EVQLRSGPDLVQPGASVTPCKASGYTF	DYNNID	WVKQSHKLEWIG	NINTYNGGTYNOKFKG	KATLTVDKPSSTAYMELRSLRSEDTATYYCAR	RLRYGHHFDY	WGQGTSLTVSS	163
SC16.62	EVMLVESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	SYAMS	WVROTPKRLWVA	YISGGDHYYPDSVRG	RFTISRDNKDTLYLQMSLRSEDTALYYCAR	VRDWWYFDV	WGAGTSLTVSS	167
SC16.63	QVQLQDSGTELLRPGASVYKISCKATIGYTF	SYWME	WVKQRPQGLEWIG	EILPSSGDTYNEKFKG	KATTTADTSSTAYMHLSSITSEDSAVYFCAR	GTNSL	WGQGTSLTVSA	171
SC16.65	QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGSLS	TSGVGVG	WVROSPKGLWLA	LWWDVKRYNPAKLS	RLTISKDASSQVFLKIASVDYADTATYYCAR	IASVYDWWYAMDY	WGQGTSLTVSS	175
SC16.67	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAVSAFTFT	TYAMN	WVROAPKGLWVA	RIRKSNMYAYYADSVKD	RFTISRDDSQSMLYQMINLKIETAMYYCVF	YYDYVY	WGQGTSLTVSA	179

FIG. 3B cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.68	QVQLQPGAEIVKPGASVKMSCKASGYTF	NYIMH	WVQRTPGGLEWIG	AIFPGNGTYSNQKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLTSLTSGDSAVYYCAR	WYGSGLVAMDY	WGQGTSTVSS	183
SC16.72	EVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF	SYVMH	WVQRKPGGLEWIG	YINPYNDGTYNEKFKG	KATLTSKSSSTAYMELSLTSEDSAVYYCAR	LRSKAMDY	WGQGTSTVSS	187
SC16.73	QVQLQSGAEIMKPGASVKISCKANGYTF	SYWIE	WLRQRFHGHEWIG	EILPGSDSNVNEKFKG	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEESAVYYCTR	GLRRDGSYYVMEH	WGQGTSTVSS	191
SC16.78	EVKLVEGGGLVPPGSLKLSCAAAGFTFG	RYVMS	WVQRTPKLEWVA	SITSGGTTYPSVVKG	RFTISRDNARNILYQIMSLRSEDTAMYYCAR	VYHYDDIFAY	WGQGTSLTVSA	195
SC16.79	EVQLQSGPELVKPGASVKISCKTSQYTF	EYTMH	WVQDSHGKLEWIG	GINPNINGTYSNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR	GPAWFAY	WGQGTSLTVSA	199
SC16.80	EVQLQDSGPELVKPGSKKISCKASGSYFT	GYSMN	WVQDSHGKLEWIG	LINPYSGGTYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR	RSDYPLVY	WGQGTSLTVSA	203
SC16.81	QVQLKESGPELVAPSQSLITCTVSGFSLT	SYGVH	WVQRPPGKLEWIG	VIVAGSGTNYNSALMS	RLSISKDKSKQVFLKMNLSLQTDDTAMYYCAK	QGNFYAMDY	WGQGTSTVSS	207
SC16.84	EVQLQDSGPELVKPGASVKMSCKASGSYFT	GYSMN	WVQDSHGKLEWIG	LINPYNGGTYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAL	GYGNVRRYFDV	WGAAGTSTVSS	211
SC16.88	QVQLQSGAEIARFPGASVKLSCKASGYTCT	SYWMQ	WVQRKPGGLEWIG	AIYPGDDTRYTKQFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSLSLASEDSAVYYCAR	GRRTEAWFAY	WGQGTSLTVSA	215
SC16.101	QVTLKESGPGILQPSQTLISLTCFSFGFSL	TSGMGVG	WIRQPSGKLEWLA	HIWADDVKNRYPALKS	RLTISKDASSSQVFLKIASVDTAETATYYCAH	ILDRAYYFDY	WGQGTSLTVS	219
SC16.103	QVTLKESGPGILKPSQTLISLTCFSFGFSL	TSGMGIG	WIRQPSGKLEWLA	HIWADDKYYNPSLKS	QLTISKDSSRNQVFLKITSVDTADTATYYCAR	RGTAYYFDY	WGQGTSLTVSS	223
SC16.104	QVQLKESGPDVQPSQTLISLCTVSGFSLT	PGVH	WVQRPPGKLEWVG	TMGWDDKYYNSALKS	RLSISRDTSKNQVFLKLSLQTEDTAMYYCTR	GGTGFYD	WGQGTSLTVSS	227
SC16.105	QVQLQPGAEIVKPGASVKLSCKASGYTF	SYVMH	WVQRKPGGLEWIG	VINPNSGRNYYNEKFKS	KATLTVDKSSSTAYMQLSLSLASEDSAVYYCAR	RRELGLVAMDY	WGQGTSTVSS	231
SC16.106	QVQLKDSGPGIVAPSQSLFITCTVSGFSLT	SYEIN	WVQRPPGKLEWIG	VIVTGGSTNYSALIS	RLSISKDKSKSLVFLKWNLSLQTDDTATYYCVR	GVIYAMDY	WGQGTSTVSS	235
SC16.107	EVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF	NYVMH	WVQRKPGGLEWIG	YINPYNDGTYNEKFKG	KATLTSKSSSTAYMALSLSLASEDSAVYYCAV	AYSNWFAY	WGQGTSLTVSA	239
SC16.108	QVQLVEEGAEIARFPGASVKLSCKASGSYVW	MQ	WVQRPPGQLEWIG	AIYPGNGDTRYTKQFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSLSLASEDSAVYYCAR	SPAYRYGEGYFDY	WGQGTSLTVSS	243
SC16.109	QIQLVQSGPELVKPGGETVYKISCKASGYTF	MYGMN	WYKQAPGKGLKWMG	WINTYTGEPAYADDFKFG	RFAPSLTSAAYLQINNLKINLKNEDATFFCAN	MRPTRGFAY	WGQGTSLTVSA	247
SC16.110	EVQLQDSGPGILVIRTGASVKISCKASGSYFT	GYYMH	WVQDSHGKLEWIG	YISYINGALTYYNQKFKG	KATHIVDTSSSTAYMQLFSLTSEDSAVYYCAR	SDGGHAMDY	WGQGTSTVSS	251
SC16.111	EVQLQDSGPELVKPGASVKISCKASGSYFT	GYNMN	WVQDSNGKLEWIG	NIDPYGSSYKQFEG	KATLTVDKSSSTAYMQLSLSLASEDSAVYYCAR	GGSNFFDY	WGQGTSLTVSS	255

FIG. 3B cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC1.6.113	DVKLVESGGELVWPGGSLKLSCAAAGFTFS	SYTWS	WVRQTPKRIEWA	TISSGGSPYPPDSVKG	RFTSRDIAKNTLYIQMSSIKSEDTAMYCTR	DVYDGY	WGQGTLLTVSS	259
SC1.6.114	EVQLQDSGAEIVKPGASVKLSCTASGFNIK	DTYIH	WVQRPEQGLEWIG	RIDFANGINTYDPKFKQG	KATITPDTSSNTAYLQLSLSITSEDTAVYCAR	SWRNWYGSFVWFYDV	WGAGTTVTVSS	263
SC1.6.115	DVKLVESGGELVWPGGSLKLSCAAAGFTFS	SYTWS	WVRQTPKRIEWA	TISSGGSPYPPDSVKG	RFTSRDIAKNTLYIQMSSIKSEDTAMYCTR	DVYDGY	WGQGTLLTVSS	267
SC1.6.116	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	SNGVH	WVRQSPKGLEWLG	VLWSGGSTVNAAFIS	RLSISKDKNSQVFLKMNLSQANDTAMYCAR	NNRYGAMDY	WGQGTSTVTVSS	271
SC1.6.117	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	NYGVH	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGITVYNSALMS	RLSISEDNKSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	NLGPYAMDY	WGQGTSTVTVSS	275
SC1.6.118	EVQLQDSGPDIVKPGASVKISCKASGYSFT	GYVMH	WVQSHGKSLWIG	RVPNNGGTYNCKFKG	KAILTADKSSSTAYMELRSITSEDSAVYCAR	GSYDYAEG	WGQGTLLTVSA	279
SC1.6.120	EIQLQDSGPELVKPGASVKVSKCASGYAFT	SYNMY	WVWQSHGKSLWIG	YVDPYNGGTYNCKFKG	KATLTVDKSSSTAYMHLNLSITSEDSAVYCAR	ENRYFDY	WGQGTLLTVSS	283
SC1.6.121	EVQLVESGGELVWPGGSLKLSCAAAGFTFN	TYAVM	WVRQAPKGLEWVA	RIRKSNYATYADSVKD	RFTSRDSONMQLQMNLIKEDTAVYCVR	QGYSDWGPWFAY	WGQGTLLTVSA	287
SC1.6.122	EVQLVESGGELVWPGGSLKLSCAAAGFTFS	DYMF	WVRQTPKRIEWA	TISDGGSTVYPPDSVKG	RFTSRDIAKNTLYIQMSSIKSEDTAMYCAR	AGTYAMDY	WGQGTSTVTVSS	291
SC1.6.123	QVALKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLS	TSGMVG	WVROPKGLEWLA	HIWDDVWRYNPAKLS	RLTISKDTSSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	MEDYSSSDFD	WGHGTTLLTVSS	295
SC1.6.124	EVQLQDSGPELVKPGASVKMCKASGYTFT	SYVMH	WVQKPGGLEWIG	YINPYNDGTYNCKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELSSITSEDSAVYCAR	GALYGNLYGVFDV	WGAGTTVTVSS	299
SC1.6.125	DVQLQESGPDIVKPGGSLITCTVGSIT	SGYSWH	WVRQPPKRIEWA	YHYSGGSTVYNSALMS	RISITRDTKSNQFLQKSNVITSEDSATYCAL	EGNYDGFAY	WGQGTLLTVSS	303
SC1.6.126	QVQMKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGSLLT	NYGVH	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGSTVYNSALMS	RLSISKDKNSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	DWEGWFAY	WGQGTLLTVSA	307
SC1.6.129	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	DYGV	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGSTVYNSALMS	RLSISKDKNSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	HYGHYAA	WGQGTLLTVSA	311
SC1.6.130	EVQLQDSGPELVKPGASVKMCKASGYTFT	SYVMH	WVQKPGGLEWIG	YINPYNDGTYNCKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELSSITSEDSAVYCAR	GVYDGYSTFDY	WGQGTLLTVSS	315
SC1.6.131	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	NYGVH	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGSTVYNSALMS	RLSISEDNKSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	NLGPYAMDY	WGQGTSTVTVSS	319
SC1.6.132	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	DYGV	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGSTVYNSALMS	RLSITKDKNSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	ORQVYGA	WGQGTLLTVSA	323
SC1.6.133	QVQLKESGPGIVAPPSQSLITCTVSGFSLT	NYAVH	WVRQPPKGLEWLG	VWAGGSTVYNSALMS	RLSISKDKNSQVFLKMNLSIQDSDTAMYCAR	KKGGWFFWFAY	WGQGTLLTVSA	327
SC1.6.134	EVQLQDSGPDIVKPGASVKISCKASGYSFT	GYVMH	WVQSHGKRIEWA	RVPNNGGTYNCKFKG	KAILTVDKSSSTAYMELRSITSEDSAVYCAR	GSYDIAEG	WGQGTLLTVSA	331
SC1.6.135	QVQLQDSGAEIVKPGASVKISCKASGYAFT	NYLIE	WVQKPGGLEWIG	VINPDSGTYNCKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELRSITSEDSAVYCAR	SDYDYAFYAMDY	WGQGTSTVTVSS	335
SC1.6.136	EVQLQDSGPELVKPGASVKMCKASGYTFT	SYVMH	WVQKPGGLEWIG	YINPYNDGTYNCKFKG	KATLTVDKSSSTAYMELSSITSEDSAVYCAR	DRSGYEDYGMIDY	WGQGTSTVTVSS	339

FIG. 3B cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 murino ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
SC16.137	EVQLVESGGDLVPPGSSKILSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQIPDKRIEWA	TISSGGSYYPDSVKG	RFTSRDNAKNTLYIQMSSLKSEDTAMYYCAR	RRADAMDY	WGQGTSVTSS	343
SC16.138	QVQLKESGPGLVAPSGSISITCTVSGFSLT	DYGVS	WIRQPPKGLLEWIG	VVWGGSTYNSALKS	RLSISKNSKISQVFLKMNLSIQDQDDTAMYYCAK	QRGQYGAY	WGQGLTVYSA	347
SC16.139	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT	NYVMH	WYKQKPGGLEWIG	YINPYNDGTRYNEKFKG	KATLTSKSSSTAYMALLSLTSEDSAVYYCAV	AYYSNWGFAY	WGQGLTVYSA	351
SC16.140	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT	SYVMH	WVKQRPQGLEWIG	MIDPSNSETRLNQKFKD	KATLNVDKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAV	MDVYFDY	WGQGITLTVSS	355
SC16.141	QVQLKQSGPGLVAPSGSLITCTVSGFSLT	SYEIN	WVRQPPKGLLEWIG	VIVTGGSTYNSALIS	RLSISKNSKISLVFLKMNLSLQDQDDTAMYYCVR	GVYAMDY	WGQGTSVTSS	359
SC16.142	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT	DYVMH	WVKQSHGKSLLEWIG	FFYPYNGNTVYSQKFKS	KATLTVDNSSTAYMEIRLSTSEDSAVYYCAR	LNWEGY	WGQGITLTVSS	363
SC16.143	QVQLQQSGPELVKPGASVRIKCKASGYTFT	SYVH	WYKQRPQGLEWIG	WVWPGNGNTVYNEKFKG	KATLTVDKSSSTAYMQLISLTSEDSAVVFCAR	ERWLLWFAY	WGQGLTVYSA	367
SC16.144	QIQLVQSGPELVKPGGETVYKISCKASGYTFT	NYGMN	WVKQAPGKGLKWWG	WINTYTGEPYADDFKGG	RFAFSLETSASTAYLIQINDLNKNEDTATYFCAR	VGDVVGFDY	WGQGITLTVSS	371
SC16.147	QIQLVQSGPELVKPGGETVYKISCKASGYTFT	DYSLH	WVKQALGKGLKWMG	WINTETGEPYADDFKGG	RFAFSLETSASTAYLIQINDLNKNEDTATYFCGI	YDGYAMDY	WGQGTSVTSS	375
SC16.148	QIQLVQSGPELVKPGGETVYKISCKASGYTLL	NYGMN	WVKQAPGKGLKWMG	WINTYTGEPYADDFKGG	RFAFSLTSARIVYLIQINLNKNEDTATYFCAK	YEAHEGFY	WGQGLTVYSA	379
SC16.149	QVQLKESGPGLVAPSGSISITCAVSGFSLT	SYGVH	WVRQPPKGLLEWIG	VVWAGSTNYVALMS	RLSISDKNSKISQVFLKMNLSIQDQDDTAMYYCAR	DWEGWFAY	WGQGLTVYSA	383
SC16.150	EIQLQQSGPELVKPGASVIVKCKASGYAFT	SYNMV	WVQSHGKSLLEWIG	YIDPYNGGTSVQKFRG	KATLTVDKSSSTAYMHLNLSLTSEDSAVYYCAR	ENRYDFD	WGQGITLTVSS	387

FIG. 3B cont.

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-DLL3 humanizado ejemplar

mAb	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO.
HSC16.13	QITLKEGPTLVKPTQTLLTCTFSGFLS	TSGMGVG	WIRQPGKALEWLA	HIWDDVKRYSPSLKS	RLTTTKDTSKNGQLVLTMTNMDPVDATYYCAR	IVSEFNDVWSAMDY	WGQGTLLTVSS	391
HSC16.15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTF	RWVH	WIRQAPGQGLEWIMG	YINPTVYTERNQFKD	RVTMTRODTSTSYVMELSSLRSEDTAVYYCAR	GGSNFFDY	WGQGTLLTVSS	395
HSC16.25	QITLKEGPTLVKPTQTLLTCTFSGFLS	TSGMGVG	WIRQPGKALEWLT	DIWDDNKYNSPSLKS	RLTTTKDTSKNGQLVLTMTNMDPVDATYYCAR	R'VNYYPDPYAMDY	WGQGTLLTVSS	399
HSC16.34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTF	NYGMN	WVRCAPGQRLEWIMG	WINTYTGDPYADDFKG	RVTITRTDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	IGGNSPSDY	WGQGTLLTVSS	403
HSC16.56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTF	NYGMN	WVRCAPGQGLEWIMG	WINTYTGEPYADDFKG	RVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	IGDSSPSDY	WGQGTLLTVSS	407

FIG. 3B cont.

Resumen del cartografiado a nivel de dominio de anticuerpos de DLL3 seleccionados

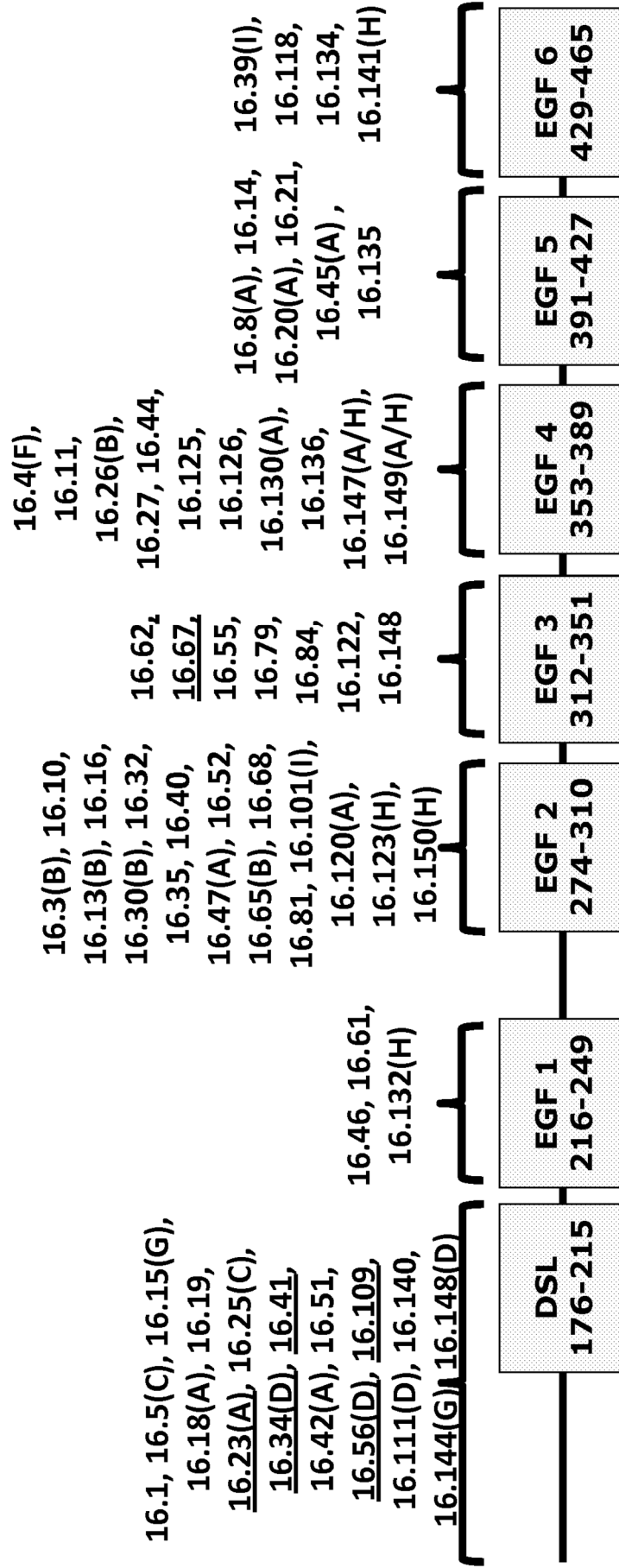


FIG. 4

Características bioquímicas de moduladores de DLL3 seleccionados

Clon	Bin	Dominio	Afinidad (nM)	Cyno XR	Ratón & Rata XR
SC16.4	F	EGF4	0.5 ^F	N.D.	Si
SC16.8	A	EGF5	0.5 ^F	N.D.	Si
SC16.10	E	EGF2	4.0 ^F	N.D.	No
SC16.13	B	EGF2	2.0 ^B	No ^Y	No
SC16.15	G	N-terminal	0.5 ^B	Si ^B	Si
SC16.25	C	N-terminal	0.2 ^B	Si ^B	No
SC16.34	D	DSL	0.2 ^B	Si ^B	Si
SC16.39	I	EGF6	1.0 ^F	N.D.	Si
SC16.46	A	EGF1	0.5 ^F	No ^Y	Si
SC16.51	H	N-terminal	2.0 ^F	Si ^B	Si
SC16.56	D	DSL	1.0 ^B	Si ^B	Si
SC16.65	B	EGF2	0.9 ^B	No ^B	No
SC16.67	D	EGF3	0.5 ^F	Si ^Y	No

^B Biacore; ^F ForteBio; ^Y Presentación en levadura

FIG. 5

Conjugados de anticuerpo y fármaco ejemplares

ADC #	ADC #	ADC #
1	SC16.3-DL1	32
2	SC16.4-DL1	33
3	SC16.5-DL1	34
4	SC16.7-DL1	35
5	SC16.8-DL1	36
6	SC16.10-DL1	37
7	SC16.11-DL1	38
8	SC16.13-DL1	39
9	SC16.15-DL1	40
10	SC16.18-DL1	41
11	SC16.19-DL1	42
12	SC16.20-DL1	43
13	SC16.21-DL1	44
14	SC16.22-DL1	45
15	SC16.23-DL1	46
16	SC16.25-DL1	47
17	SC16.26-DL1	48
18	SC16.29-DL1	49
19	SC16.30-DL1	50
20	SC16.31-DL1	51
21	SC16.34-DL1	52
22	SC16.35-DL1	53
23	SC16.36-DL1	54
24	SC16.38-DL1	55
25	SC16.41-DL1	56
26	SC16.42-DL1	57
27	SC16.45-DL1	58
28	SC16.47-DL1	59
29	SC16.49-DL1	60
30	SC16.50-DL1	61
31	SC16.52-DL1	62
	SC16.55-DL1	63
	SC16.56-DL1	64
	SC16.57-DL1	65
	SC16.58-DL1	66
	SC16.61-DL1	67
	SC16.62-DL1	68
	SC16.63-DL1	69
	SC16.65-DL1	70
	SC16.67-DL1	71
	SC16.68-DL1	72
	SC16.72-DL1	73
	SC16.73-DL1	74
	SC16.78-DL1	75
	SC16.79-DL1	76
	SC16.80-DL1	77
	SC16.81-DL1	78
	SC16.84-DL1	79
	SC16.88-DL1	80
	SC16.101-DL1	81
	SC16.103-DL1	82
	SC16.104-DL1	83
	SC16.105-DL1	84
	SC16.106-DL1	85
	SC16.107-DL1	86
	SC16.108-DL1	87
	SC16.109-DL1	88
	SC16.110-DL1	89
	SC16.111-DL1	90
	SC16.113-DL1	91
	SC16.114-DL1	92
	SC16.115-DL1	
	SC16.116-DL1	
	SC16.117-DL1	
	SC16.118-DL1	
	SC16.120-DL1	
	SC16.121-DL1	
	SC16.122-DL1	
	SC16.123-DL1	
	SC16.124-DL1	
	SC16.125-DL1	
	SC16.126-DL1	
	SC16.129-DL1	
	SC16.130-DL1	
	SC16.131-DL1	
	SC16.132-DL1	
	SC16.133-DL1	
	SC16.134-DL1	
	SC16.135-DL1	
	SC16.136-DL1	
	SC16.137-DL1	
	SC16.138-DL1	
	SC16.139-DL1	
	SC16.140-DL1	
	SC16.141-DL1	
	SC16.142-DL1	
	SC16.143-DL1	
	SC16.144-DL1	
	SC16.147-DL1	
	SC16.148-DL1	
	SC16.149-DL1	
	SC16.150-DL1	

FIG. 6

Conjugados de anticuerpo y fármaco ejemplares

ADC #	ADC #	ADC #	ADC #
93	SC16.3-DL2	124	SC16.55-DL2
94	SC16.4-DL2	125	SC16.56-DL2
95	SC16.5-DL2	126	SC16.57-DL2
96	SC16.7-DL2	127	SC16.58-DL2
97	SC16.8-DL2	128	SC16.61-DL2
98	SC16.10-DL2	129	SC16.62-DL2
99	SC16.11-DL2	130	SC16.63-DL2
100	SC16.13-DL2	131	SC16.65-DL2
101	SC16.15-DL2	132	SC16.67-DL2
102	SC16.18-DL2	133	SC16.68-DL2
103	SC16.19-DL2	134	SC16.72-DL2
104	SC16.20-DL2	135	SC16.73-DL2
105	SC16.21-DL2	136	SC16.78-DL2
106	SC16.22-DL2	137	SC16.79-DL2
107	SC16.23-DL2	138	SC16.80-DL2
108	SC16.25-DL2	139	SC16.81-DL2
109	SC16.26-DL2	140	SC16.84-DL2
110	SC16.29-DL2	141	SC16.88-DL2
111	SC16.30-DL2	142	SC16.101-DL2
112	SC16.31-DL2	143	SC16.103-DL2
113	SC16.34-DL2	144	SC16.104-DL2
114	SC16.35-DL2	145	SC16.105-DL2
115	SC16.36-DL2	146	SC16.106-DL2
116	SC16.38-DL2	147	SC16.107-DL2
117	SC16.41-DL2	148	SC16.108-DL2
118	SC16.42-DL2	149	SC16.109-DL2
119	SC16.45-DL2	150	SC16.110-DL2
120	SC16.47-DL2	151	SC16.111-DL2
121	SC16.49-DL2	152	SC16.113-DL2
122	SC16.50-DL2	153	SC16.114-DL2
123	SC16.52-DL2	154	SC16.115-DL2
			SC16.116-DL2
			SC16.117-DL2
			SC16.118-DL2
			SC16.120-DL2
			SC16.121-DL2
			SC16.122-DL2
			SC16.123-DL2
			SC16.124-DL2
			SC16.125-DL2
			SC16.126-DL2
			SC16.129-DL2
			SC16.130-DL2
			SC16.131-DL2
			SC16.132-DL2
			SC16.133-DL2
			SC16.134-DL2
			SC16.135-DL2
			SC16.136-DL2
			SC16.137-DL2
			SC16.138-DL2
			SC16.139-DL2
			SC16.140-DL2
			SC16.141-DL2
			SC16.142-DL2
			SC16.143-DL2
			SC16.144-DL2
			SC16.147-DL2
			SC16.148-DL2
			SC16.149-DL2
			SC16.150-DL2

FIG. 6 cont.

Conjugados de anticuerpo y fármaco ejemplares

ADC #	ADC #	ADC #
277	SC16.3-DL4	308
278	SC16.4-DL4	309
279	SC16.5-DL4	310
280	SC16.7-DL4	311
281	SC16.8-DL4	312
282	SC16.10-DL4	313
283	SC16.11-DL4	314
284	SC16.13-DL4	315
285	SC16.15-DL4	316
286	SC16.18-DL4	317
287	SC16.19-DL4	318
288	SC16.20-DL4	319
289	SC16.21-DL4	320
290	SC16.22-DL4	321
291	SC16.23-DL4	322
292	SC16.25-DL4	323
293	SC16.26-DL4	324
294	SC16.29-DL4	325
295	SC16.30-DL4	326
296	SC16.31-DL4	327
297	SC16.34-DL4	328
298	SC16.35-DL4	329
299	SC16.36-DL4	330
300	SC16.38-DL4	331
301	SC16.41-DL4	332
302	SC16.42-DL4	333
303	SC16.45-DL4	334
304	SC16.47-DL4	335
305	SC16.49-DL4	336
306	SC16.50-DL4	337
307	SC16.52-DL4	338
	SC16.55-DL4	339
	SC16.56-DL4	340
	SC16.57-DL4	341
	SC16.58-DL4	342
	SC16.61-DL4	343
	SC16.62-DL4	344
	SC16.63-DL4	345
	SC16.65-DL4	346
	SC16.67-DL4	347
	SC16.68-DL4	348
	SC16.72-DL4	349
	SC16.73-DL4	350
	SC16.78-DL4	351
	SC16.79-DL4	352
	SC16.80-DL4	353
	SC16.81-DL4	354
	SC16.84-DL4	355
	SC16.88-DL4	356
	SC16.101-DL4	357
	SC16.103-DL4	358
	SC16.104-DL4	359
	SC16.105-DL4	360
	SC16.106-DL4	361
	SC16.107-DL4	362
	SC16.108-DL4	363
	SC16.109-DL4	364
	SC16.110-DL4	365
	SC16.111-DL4	366
	SC16.113-DL4	367
	SC16.114-DL4	368
	SC16.115-DL4	

FIG. 6 cont.

Conjugados de anticuerpo y fármaco ejemplares

ADC #	ADC #	ADC #	ADC #
369	SC16.3-DL5	400	SC16.55-DL5
370	SC16.4-DL5	401	SC16.56-DL5
371	SC16.5-DL5	402	SC16.57-DL5
372	SC16.7-DL5	403	SC16.58-DL5
373	SC16.8-DL5	404	SC16.61-DL5
374	SC16.10-DL5	405	SC16.62-DL5
375	SC16.11-DL5	406	SC16.63-DL5
376	SC16.13-DL5	407	SC16.65-DL5
377	SC16.15-DL5	408	SC16.67-DL5
378	SC16.18-DL5	409	SC16.68-DL5
379	SC16.19-DL5	410	SC16.72-DL5
380	SC16.20-DL5	411	SC16.73-DL5
381	SC16.21-DL5	412	SC16.78-DL5
382	SC16.22-DL5	413	SC16.79-DL5
383	SC16.23-DL5	414	SC16.80-DL5
384	SC16.25-DL5	415	SC16.81-DL5
385	SC16.26-DL5	416	SC16.84-DL5
386	SC16.29-DL5	417	SC16.88-DL5
387	SC16.30-DL5	418	SC16.101-DL5
388	SC16.31-DL5	419	SC16.103-DL5
389	SC16.34-DL5	420	SC16.104-DL5
390	SC16.35-DL5	421	SC16.105-DL5
391	SC16.36-DL5	422	SC16.106-DL5
392	SC16.38-DL5	423	SC16.107-DL5
393	SC16.41-DL5	424	SC16.108-DL5
394	SC16.42-DL5	425	SC16.109-DL5
395	SC16.45-DL5	426	SC16.110-DL5
396	SC16.47-DL5	427	SC16.111-DL5
397	SC16.49-DL5	428	SC16.113-DL5
398	SC16.50-DL5	429	SC16.114-DL5
399	SC16.52-DL5	430	SC16.115-DL5
			SC16.116-DL5
			SC16.117-DL5
			SC16.118-DL5
			SC16.120-DL5
			SC16.121-DL5
			SC16.122-DL5
			SC16.123-DL5
			SC16.124-DL5
			SC16.125-DL5
			SC16.126-DL5
			SC16.129-DL5
			SC16.130-DL5
			SC16.131-DL5
			SC16.132-DL5
			SC16.133-DL5
			SC16.134-DL5
			SC16.135-DL5
			SC16.136-DL5
			SC16.137-DL5
			SC16.138-DL5
			SC16.139-DL5
			SC16.140-DL5
			SC16.141-DL5
			SC16.142-DL5
			SC16.143-DL5
			SC16.144-DL5
			SC16.147-DL5
			SC16.148-DL5
			SC16.149-DL5
			SC16.150-DL5

FIG. 6 cont.

Conjugados de anticuerpo humanizado y fármaco ejemplares

ADC #	ADC #	ADC #	ADC #	ADC #	ADC #	ADC #	ADC #
461	hSC16.13-DL1	hSC16.13-DL2	hSC16.13-DL3	hSC16.13-DL4	hSC16.13-DL5	476	481
462	hSC16.15-DL1	hSC16.15-DL2	hSC16.15-DL3	hSC16.15-DL4	hSC16.15-DL5	477	482
463	hSC16.25-DL1	hSC16.25-DL2	hSC16.25-DL3	hSC16.25-DL4	hSC16.25-DL5	478	483
464	hSC16.34-DL1	hSC16.34-DL2	hSC16.34-DL3	hSC16.34-DL4	hSC16.34-DL5	479	484
465	hSC16.56-DL1	hSC16.56-DL2	hSC16.56-DL3	hSC16.56-DL4	hSC16.56-DL5	480	485

FIG. 6 cont.