

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 767**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2019 PCT/US2019/025057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2019 WO19191728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2019 E 19717173 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3773910**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco anti-antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) humanizado**

30 Prioridad:

**29.03.2018 US 201862650277 P**

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

**21.11.2024**

73 Titular/es:

**AMBRX, INC. (100.0%)  
10975 North Torrey Pines Road  
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**BHOWMIK, SHIVARUPAM;  
WANG, JIANING;  
XIA, JINMING;  
BRADY, WILLIAM y  
TIAN, FENG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 767 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-fármaco anti-antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) humanizado

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La divulgación de la invención se refiere a nuevos anticuerpos de antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) y conjugados anticuerpo-fármaco. Más particularmente, la divulgación de la invención se refiere a métodos y composiciones para usar conjugados de fármacos de anticuerpos anti-PSMA en la inhibición, prevención o tratamiento de enfermedades o cánceres relacionados con PSMA.

## FONDO DE LA INVENCION

15 [0002] El cáncer de próstata es la neoplasia maligna no relacionada con la piel más comúnmente diagnosticada en varones en los países desarrollados. Se calcula que uno de cada seis varones será diagnosticado de cáncer de próstata. El diagnóstico del cáncer de próstata ha mejorado tras el uso de marcadores séricos como el antígeno prostático específico (PSA). Además, los antígenos asociados a tumores de próstata ofrecen dianas para la obtención de imágenes de tumores, el diagnóstico y las terapias dirigidas. El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), un marcador asociado a los tumores de próstata, es una de esas dianas. PSMA se sobreexpresa significativamente en el

20 cáncer de próstata independiente de andrógenos. La sobreexpresión de PSMA se asocia con un alto grado tumoral, un alto riesgo de progresión de la enfermedad y recurrencia (Perner et al, Human Pathology, 2007). La expresión elevada de PSMA se ha asociado con un pronóstico clínico negativo y una supervivencia significativamente más corta. La expresión de PSMA se observa tanto en el sitio primario de la enfermedad como en los sitios metastásicos, como los huesos y los ganglios linfáticos (Olson and Israel, Frontiers in Bioscience, 2014).

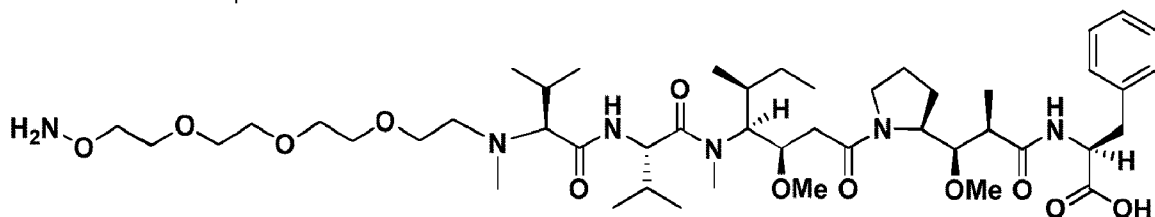
25 [0003] Aunque a lo largo de los años se han llevado a cabo varias terapias dirigidas, las que implican radioterapias son las que más han avanzado hacia el desarrollo clínico, ya que han demostrado tanto su eficacia como una tolerabilidad aceptable. Otros desarrollos clínicos de modalidades que implican la administración dirigida de agentes citotóxicos no radiactivos han tenido un éxito limitado.

30 [0004] Dadas las propiedades físicas de PSMA y su patrón de expresión en relación con la progresión del cáncer de próstata, PSMA es una diana excelente en el desarrollo de conjugados anticuerpo-fármaco. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son una clase potente de constructos terapéuticos que permiten la administración dirigida de agentes citotóxicos a células diana, como las células cancerosas. Debido a la función de focalización, estos compuestos muestran un índice terapéutico mucho mayor en comparación con los mismos agentes administrados sistémicamente. Los ADC se han desarrollado como anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos, como los scFv. El anticuerpo o fragmento está unido a una o más copias del fármaco mediante un engarce que es estable en condiciones fisiológicas, pero que puede escindirse una vez dentro de la célula diana. Hasta la fecha, solo se ha aprobado el uso terapéutico de un par de ADC, como gemtuzumab ozogamicina para AML (posteriormente retirado del mercado), brentuximab vedotina para ALCL y el linfoma de Hodgkin, y trastuzumab emtansina para el cáncer de mama metastásico HER2-positivo (Verma et al., N Engl J Med 367:1783-91, 2012; Bross et al., Clin Cancer Res 7:1490-96, 2001; Francisco et al., Blood 102:1458-65, 2003). Se están realizando ensayos clínicos con varios ADC dirigidos a diversos agentes. Sin embargo, los ADC dirigidos a PSMA se enfrentan a retos debido a la falta de índice terapéutico y toxicidad. Los documentos WO 2017/212250 y WO 2018/033749 proporcionan anticuerpos conjugados humanizados derivados de J591.

45 [0005] Por lo tanto, existe la necesidad de terapias mejores o mejoradas dirigidas contra el antígeno PSMA y los cánceres relacionados. Para superar esta deficiencia en la técnica, la presente divulgación de invención proporciona anticuerpos anti-PSMA novedosos, variantes y composiciones de conjugados anticuerpo-fármaco, en el presente documento.

## 50 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] En una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anticuerpo anti-PSMA) conjugado con un enlazador de fármaco, en el que la conjugación se produce a través de una para-acetilo fenilalanina incorporada en la secuencia de cadena pesada, en el que el anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º: 8 y la secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º: 9, en el que se incorpora una para-acetilo fenilalanina en la posición A114 de la cadena pesada según el esquema de numeración de Kabat, y en el que el ligando farmacológico es una monometilo auristatina F no escindible que tiene la estructura:



5 [0007] En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco de la invención y al menos un adyuvante, aglutinante, tampón, portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0008] En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de la invención, que comprende además un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide, o una combinación de los mismos.

10 [0009] En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, comprendiendo dicho método el contacto del cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica.

15 [0010] En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica de la invención y un agente terapéutico adicional, para su uso en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, dicho método comprende contactar el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, y que comprende además poner en contacto el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, en el que el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

20 [0011] En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica de la invención para su uso con un agente terapéutico adicional en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, dicho método comprende contactar el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, y comprende además poner en contacto el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, en el que el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

25 [0012] En otra realización, la presente invención proporciona un agente terapéutico adicional, para su uso con un conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica de la invención en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, comprendiendo dicho método contactar el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, y que comprende además poner en contacto el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o de la composición farmacéutica, donde el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

30 [0013] En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, un conjugado de anticuerpo y fármaco o una composición farmacéutica y un agente terapéutico adicional, un conjugado de anticuerpo y fármaco o una composición farmacéutica; o un agente terapéutico adicional para su uso según la presente invención, en el que el agente terapéutico adicional es un agente hormonal, y en el que el agente hormonal es enzalutamida.

## RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN ADICIONAL

35 [0014] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PSMA, variantes de anticuerpos y composiciones de conjugados anticuerpo-fármaco. En otros aspectos, la divulgación proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden dichos anticuerpos anti-PSMA.

40 [0015] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PSMA, variantes de anticuerpos y composición de anticuerpos que comprenden SEQ ID N.º: 1 a 17. En algunos aspectos, la divulgación proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden SEQ ID N.º: 1 a 17.

45 [0016] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PSMA, variantes de anticuerpos y composición de anticuerpos consistentes en SEQ ID N.º: 1 a 17. En algunos aspectos, la divulgación proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que consisten en SEQ ID N.º: 1 a 17.

50 [0017] La presente divulgación proporciona una variante de anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) que comprende una cadena pesada y una cadena ligera en la que la secuencia de la cadena pesada se selecciona del grupo de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, 14, o 16 y la secuencia de cadena ligera se selecciona del grupo de SEQ ID N.º: 9, 11, 13, 15, o 17. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una variante de anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) que comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, 14, o 16. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una variante de anticuerpo anti-

antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º 9, 11, 13, 15, o 17.

**[0018]** En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una variante de anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) que consiste en una secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º 8, 10, 12, 14, o 16. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una variante de anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anti-PSMA) que consiste en una secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º 9, 11, 13, 15, o 17.

**[0019]** En otro aspecto, la variante de anticuerpo anti-PSMA comprende una cadena pesada que comprende una región de secuencia variable seleccionada del grupo de SEQ ID N.º 1 o 6. En aún otro aspecto, la variante de anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de cadena ligera que comprende una región variable seleccionada del grupo de SEQ ID N.º 2-5 o 7. En otro aspecto, la variante de cadena pesada del anticuerpo anti-PSMA consiste en una secuencia de región variable de SEQ ID N.º 1 o 6. En aún otro aspecto, la variante de cadena ligera del anticuerpo anti-PSMA consiste en una región variable seleccionada del grupo de SEQ ID N.º 2-5 o 7.

**[0020]** En otro aspecto, la variante de anticuerpo anti-PSMA comprende un aminoácido no natural incorporado en la secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo. En otro aspecto de la presente divulgación, el anticuerpo comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA con uno o más aminoácidos codificados no naturalmente sustituidos en una o más posiciones en la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo. En algunos aspectos, la cadena pesada o la cadena ligera en la variante del anticuerpo PSMA comprende, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos codificados no naturalmente. En otros aspectos, la secuencia de cadena pesada o cadena ligera en la variante de anticuerpo PSMA comprende, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos codificados no naturalmente en una o más posiciones en la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo. En un aspecto, la secuencia de cadena pesada del anticuerpo anti-PSMA comprende un aminoácido codificado de forma no natural. En otro aspecto de la presente divulgación, la variante de anticuerpo anti-PSMA comprende una secuencia de cadena pesada o ligera como se presenta en la Tabla 4.

**[0021]** En otros aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo es una variante de anticuerpo anti-PSMA que comprende la secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º 9, 11, 13, 15, o 17 con un aminoácido codificado no naturalmente sustituido en una posición con alta accesibilidad superficial y/o un sitio que será de carga neutra para el anticuerpo. En otros aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo es una variante de anticuerpo anti-PSMA que comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º 8, 10, 12, 14, o 16 con un aminoácido codificado no naturalmente sustituido en una posición con alta accesibilidad superficial y/o un sitio que será de carga neutra para el anticuerpo.

**[0022]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco anti-PSMA (ADC o un ADC anti-PSMA) en el que el anticuerpo es un anti-PSMA que comprende una secuencia de cadena ligera y pesada. En otros aspectos de la presente divulgación, el ADC anti-PSMA comprende la cadena ligera de SEQ ID N.º 9, 11, 13, 15, o 17 y la cadena pesada de SEQ ID N.º 8, 10, 12, 14, o 16. En un aspecto de la presente divulgación, el ADC anti-PSMA comprende con uno o más aminoácidos codificados no naturalmente sustituidos en una o más posiciones en la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo.

**[0023]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ADC anti-PSMA que comprende una cadena pesada SEQ. ID. N.º 8 y una ligera de SEQ. ID. N.º 9. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ADC anti-PSMA que comprende SEQ ID N.º 12 y SEQ ID N.º 13. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ADC anti-PSMA que comprende SEQ ID N.º 14 y SEQ ID N.º 15. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ADC anti-PSMA que comprende SEQ ID N.º 16 y SEQ ID N.º 17.

**[0024]** En algunos aspectos, el anticuerpo, variante o composición de la presente divulgación puede ser un anticuerpo, variante o composición que se une a un receptor PSMA. En otros aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo, variante o composición puede ser un anticuerpo, variante o composición que se une a la superficie extracelular del receptor PSMA. En otro aspecto de la presente divulgación, el anticuerpo, variante o composición divulgados pueden ser un anticuerpo, variante, o composición que se unen a un dímero PSMA. En algunos aspectos, el anticuerpo, variante o composición de la presente divulgación puede ser un anticuerpo, variante, o composición que tiene CDR de J591 injertadas en la región marco de la región variable. En otros aspectos, el anticuerpo, variante o composición de la presente divulgación puede ser un anticuerpo, variante, o composición que tenga un aminoácido codificado de forma no natural. En algunos aspectos, el anticuerpo, variante o composición puede ser un anticuerpo, variante, o composición que se describe en más de uno de los aspectos de la presente divulgación. En algunos aspectos, el anticuerpo, la variante de anticuerpo o la(s) composición(es) de anticuerpo divulgada(s) en el presente documento puede(n) estar totalmente humanizada(s). En otros aspectos, el anticuerpo, la variante de anticuerpo o la(s) composición(es) de anticuerpo aquí divulgados pueden ser quiméricos. En algunos aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa (Variable + regiones Fc), Fab, biespecífico, Fab-dímeros, Fab-biespecífico, Fab-triespecífico, captadores de células T biespecíficos, anticuerpo de re-direccionamiento de doble afinidad, anticuerpo biespecífico IgG1/IgG3, diabodia, diabodia biespecífico, scFv-Fc, minicuerpo.

**[0025]** En otros aspectos, el anticuerpo anti-PSMA, la variante de anticuerpo o la composición de anticuerpo incorpora un aminoácido codificado no natural que comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En un aspecto de la divulgación, el aminoácido

codificado no natural comprende un grupo aminooxi. En otros aspectos, el aminoácido codificado no naturalmente es para-acetilo fenilalanina, p-nitrofenilalanina, p-sulfotirosina, p-carboxifenilalanina, una o-nitrofenilalanina, una m-nitrofenilalanina, una p-boronilo fenilalanina, una o-boronilfenilalanina, una m-boronilfenilalanina, una p-aminofenilalanina, una o-aminofenilalanina, una m-aminofenilalanina, una p-acilfenilalanina, una o-acilfenilalanina, una m-acilfenilalanina, una p-OMe fenilalanina, una o-OMe fenilalanina, una m-OMe fenilalanina, una p-sulfofenilalanina, una o-sulfofenilalanina, una m-sulfofenilalanina, un 5-nitro His, un 3-nitro Tyr, un 2-nitro Tyr, un nitro sustituido Leu, un nitro sustituido His, un nitro sustituido De, un nitro sustituido Trp, un 2-nitro Trp, un 4-nitro Trp, un 5-nitro Trp, un 6-nitro Trp, un 7-nitro Trp, 3-aminotirosina, 2-aminotirosina, O-sulfotirosina, 2-sulfooxifenilalanina, 3-sulfooxifenilalanina, o-carboxifenilalanina, m-carboxifenilalanina, una p-acetilo-L-fenilalanina, una p-propargil-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alilo-L-tirosina, una 4-propilo-L-tirosina, una tri-O-acetilo-GlcNAc $\beta$ -serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropilo-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acilo-L-fenilalanina, una p-benzoilo-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromo-fenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropilo-L-fenilalanina o una p-propargiloxifenilalanina. En otro aspecto de la presente divulgación, el aminoácido no natural es para-acetilo fenilalanina.

**[0026]** En otros aspectos de la presente divulgación, la variante de anticuerpo anti-PSMA es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico. En un aspecto, la variante de anticuerpo humanizado anti-PSMA comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, o 14 y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID N.º: 9, 11, 13, o 15. En otro aspecto, la variante de anticuerpo quimérico anti-PSMA comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º: 16 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º: 17.

**[0027]** En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA conjugada covalentemente con una toxina, carga útil o enlazador de fármaco. En un aspecto, la toxina, la carga útil o el enlazador de fármacos comprende un agente citotóxico. En un aspecto, el agente citotóxico es una dolastatina, un derivado de la dolastatina o un análogo de los mismos. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA conjugada covalentemente con un enlazador de fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente en el anticuerpo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA de cualquiera de los SEQ ID N.º: 1 a 17 conjugados covalentemente a una o más dolastatinas en las que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente en el anticuerpo. En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA de cualquiera de los SEQ ID N.º: 8 a 17 conjugados covalentemente a una o más dolastatinas en las que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente en el anticuerpo. En un aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de secuencia de cadena pesada de anticuerpo anti-PSMA de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, 14, o 16 conjugados covalentemente con una o más dolastatinas en las que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado naturalmente en el anticuerpo. En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición de un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende una variante de cadena ligera de anticuerpo anti-PSMA de SEQ ID N.º: 9, 11, 13, 15, o 17 conjugados covalentemente a una o más dolastatinas en las que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente en el anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo se conjuga covalentemente con al menos 2 dolastatinas. En un aspecto, la composición comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más derivados o análogos de dolastatina. En un aspecto, la composición comprende un derivado de la dolastatina o es un análogo de la dolastatina. En otro aspecto, el derivado o análogo de dolastatina es una monometil auristatina, la monometil auristatina es monometil auristatina F (MMAF) o monometil auristatina E (MMAE). En otros aspectos, la una o más dolastatina es MMAF no escindible, MMAE no escindible, MMAF escindible, MMAE escindible, MMAF escindible corto, o MMAE escindible corto. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo está unido a un enlazador, un polímero o una molécula biológicamente activa. En algunos aspectos, el enlazador es polietilenglicol (PEG). En otros aspectos, el enlazador es un polietilenglicol ramificado o lineal. En otros aspectos de la presente divulgación, las variantes anti-PSMA pueden ser PEGiladas. En otros aspectos de la presente divulgación, las variantes anti-PSMA pueden estar PEGiladas en el aminoácido no codificado naturalmente. El anticuerpo anti-PSMA de la presente divulgación puede ser PEGilado con aproximadamente 5 kDa PEG, aproximadamente 10 kDa PEG, aproximadamente 20 kDa PEG, aproximadamente 30 kDa PEG, aproximadamente 40 kDa PEG o mayor. La molécula de poli(etilenglicol) puede tener un peso molecular de entre 0,1 kDa y 100 kDa aproximadamente. La molécula de poli(etilenglicol) puede tener un peso molecular entre 0,1 kDa y 50 kDa, 20 kDa y 40 kDa, y cualquier valor entero entre 25 kDa y 35 kDa. La molécula de poli(etilenglicol) puede tener un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. La molécula de poli(etilenglicol) puede ser una molécula lineal con un peso molecular comprendido entre 0,1 kDa y 50 kDa, 20 kDa y 40 kDa, y cualquier valor entero comprendido entre 25 kDa y 35 kDa. La molécula de poli(etilenglicol) puede ser una molécula lineal con un peso molecular de 30 kDa. La molécula de poli(etilenglicol) puede tener un grupo aminooxi capaz de reaccionar con un grupo acetilo de un aminoácido sintético. La molécula de poli(etilenglicol) puede ser un PEG lineal aminooxi activado de 30 kDa capaz de formar un enlace oxima con la cadena lateral acetilo de un aminoácido no codificado naturalmente como, por ejemplo, la paraacetil fenilalanina.

**[0028]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo humanizado anti-PSMA que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, 14, o 16 y una secuencia de cadena ligera seleccionada entre SEQ ID N.º: 9, 11, 13, 15, conjugado con al menos un

enlazador de fármaco seleccionado de las Tablas 1-3, en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente incorporado en la secuencia de la cadena pesada. En algunos aspectos, el enlazador de fármacos comprende es un agente citotóxico. El agente citotóxico es una dolastatina, un derivado de la dolastatina o un análogo de los mismos. En un aspecto, la dolastatina, el derivado de dolastatina o el análogo es una monometil auristatina seleccionada entre monometil auristatina F (MMAF) o monometil auristatina E (MMAE). En otro aspecto, la monometilo auristatina es MMAE o MMAF escindible, MMAE o MMAF no escindible, MMAE o MMAF escindible corto.

**[0029]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir o inhibir el crecimiento o la progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA que comprende el contacto del cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco. El conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo humanizado anti-PSMA que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID N.º: 8, 10, 12, 14, o 16 y una secuencia de cadena ligera seleccionada entre SEQ ID N.º: 9, 11, 13, 15, conjugado con al menos un enlazador de fármaco seleccionado de las Tablas 1-3, en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente incorporado en la secuencia de la cadena pesada. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende además poner en contacto un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz de un agente terapéutico. En otro aspecto, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos. En un aspecto, el agente hormonal es enzalutamida.

**[0030]** En otros aspectos, los ADC anti-PSMA de la divulgación pueden administrarse con uno o más agentes inmunoestimulantes para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria. Dichos agentes inmunoestimulantes incluyen, entre otros, IL-2, oligonucleótidos inmunoestimulantes (por ejemplo, motivos CpG), interferones, factor de necrosis tumoral alfa. En otros aspectos, los ADC anti-PSMA de la divulgación pueden administrarse con uno o más inmunomoduladores incluyendo, pero sin limitarse a, citoquinas, quimioquinas, adyuvantes o una combinación de los mismos.

**[0031]** En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento o la progresión tumoral en un sujeto que comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fármaco de anticuerpo PSMA de la divulgación. En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer de próstata que comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.

**[0032]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer o una célula cancerosa que expresa PSMA que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado anticuerpo-fármaco para tratar el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA, en el que el conjugado anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo PSMA que comprende una secuencia de cadena pesada y cadena ligera de la divulgación en el presente documento conjugada con un enlazador de fármaco a través de un aminoácido codificado no naturalmente incorporado en el anticuerpo; y en el que el enlazador de fármaco se selecciona de las Tablas 1-3. En otro aspecto, un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o cáncer relacionados con PSMA que comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de fármaco anticuerpo anti-PSMA y un agente terapéutico. El agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos. El agente terapéutico puede proporcionarse antes, después o junto con un ADC anti-PSMA de la divulgación.

**[0033]** En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de anticuerpo anti-PSMA y al menos un adyuvante, aglutinante, tampón, portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de la divulgación y al menos un adyuvante, aglutinante, tampón, portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico. En un aspecto que la divulgación proporciona u un medicamento para la fabricación y para tratar el cáncer en un sujeto en necesidad de la misma.

**[0034]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de los SEQ ID N.º: 1-17. En un aspecto, la divulgación proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de SEQ ID N.º: 1-17.

**[0035]** Debe entenderse que los métodos y composiciones descritos en el presente documento no se limitan a la metodología, protocolos, líneas celulares, construcciones, y reactivos particulares descritos en el presente documento y, como tales, pueden variar. Asimismo, debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente aspectos particulares y no pretende limitar el alcance de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, que estarán limitados únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

**[0036]** Tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

**[0037]** A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende para un experto en la técnica a la que pertenecen las invenciones descritas en el presente documento. En la práctica o ensayo de las invenciones aquí descritas pueden utilizarse diversos métodos, materiales y similares o equivalentes a los aquí descritos.

**[0038]** En aspectos de la presente divulgación se proporcionan nuevas secuencias de aminoácidos anti-PSMA. El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales o no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y la pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a modo de ejemplo únicamente, un  $\alpha$ -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo funcional R. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos peptídicos modificados, pero conservando la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Ejemplos no limitantes de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metilsulfonio. Los aminoácidos pueden denominarse aquí por su nombre, por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Además, se puede hacer referencia a los nucleótidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

**[0039]** Un "grupo de modificación amino o carboxi terminal" se refiere a cualquier molécula que pueda unirse a un grupo amino terminal o a un grupo carboxi terminal, respectivamente. A modo de ejemplo, dichos grupos amina terminales o grupos carboxi terminales pueden estar en el extremo de moléculas poliméricas, en las que dichas moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos, y polisacáridos. Los grupos de modificación de la terminación incluyen, entre otros, diversos polímeros solubles en agua, péptidos o proteínas. A modo de ejemplo únicamente, los grupos de modificación de la terminación incluyen el polietilenglicol o la albúmina sérica. Los grupos de modificación de la terminación pueden utilizarse para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, incluyendo, pero sin limitarse a ello, el aumento de la semivida sérica de los péptidos, polipéptidos o proteínas.

**[0040]** En algunos aspectos, la divulgación proporciona nuevos anticuerpos anti-PSMA y variantes de anticuerpos. El término "anticuerpo" se refiere aquí a una proteína formada por uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por la totalidad o parte de los genes de anticuerpo. Los genes de inmunoglobulina incluyen, entre otros, los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Por anticuerpo también se entienden los anticuerpos de longitud completa y los fragmentos de anticuerpos, así como los anticuerpos que existen de forma natural en cualquier organismo, las variantes de anticuerpos, los anticuerpos artificiales y los fragmentos de anticuerpos. Por anticuerpo también se entienden los anticuerpos intactos, monoclonales o policlonales. Por anticuerpo también se entienden los anticuerpos multiespecíficos y/o biespecíficos. Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos suelen estar formados por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, cada una de ellas con regiones variables y regiones constantes. La región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones marco. La región variable de la cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones marco.

**[0041]** El término "fragmento de anticuerpo" se refiere aquí a cualquier forma de un anticuerpo distinta de la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa, y anticuerpos que han sido diseñados, como las variantes de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fc, Fab, y (Fab')<sub>2</sub>, Fv de cadena única (scFv), *diabodies*, *tribodies*, *tetradodies*, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras, y regiones variables, y moléculas no anticuerpo de andamiaje alternativo, anticuerpos biespecíficos y similares (Maynard & Georgiou, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76, 2000; Hudson, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402, 1998). Otra subestructura funcional es un Fv de cadena única (scFv), compuesto por las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina, unidas covalentemente por un enlazador peptídico (Hu et al., Cancer Research, 56, 3055-3061, 1996). Estas proteínas pequeñas (Mr 25.000) suelen conservar la especificidad y la afinidad por el antígeno en un solo polipéptido y pueden constituir un bloque de construcción conveniente para moléculas específicas de antígeno más grandes. A menos que se indique específicamente lo contrario, las declaraciones y reivindicaciones que utilizan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".

**[0042]** En realizaciones de la presente invención, se divulgan nuevos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) anti-PSMA. El término "conjugado anticuerpo-fármaco", o "ADC", tal como se utiliza aquí, se refiere a una molécula de anticuerpo, o fragmento de la misma, que está unida covalentemente a una o más molécula(s) biológicamente activa(s). La molécula biológicamente activa puede conjugarse con el anticuerpo mediante un enlazador, polímero, u otro enlace covalente. Los ADC son una potente clase de construcciones terapéuticas que permiten la administración dirigida de agentes citotóxicos a células diana, como las cancerosas. Debido a la función de focalización, estos compuestos muestran un índice terapéutico mucho mayor en comparación con los mismos agentes administrados sistémicamente. Los ADC se han desarrollado como anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos, como los scFv. El anticuerpo o fragmento está unido a una o más copias del fármaco mediante un engarce que es estable en condiciones fisiológicas, pero que puede escindir-se una vez dentro de la célula diana.

**[0043]** El término "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un

anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo son (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente formado por los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR), por ejemplo,  $V_H$  CDR3 que comprende o no secuencia adicional (enlazador, región(es) marco, etc.) y (v) una combinación de dos a seis CDR aisladas que comprenden o no secuencia adicional (enlazador, región(es) marco, etc.). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena polipeptídica en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426, 1988); y (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena simple también se incluyen en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una región variable de cadena pesada fusionada a una región variable de cadena ligera mediante un péptido enlazador) que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. La región bisagra puede modificarse sustituyendo uno o más residuos de cisteína por residuos de serina para evitar la dimerización. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión se describen en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

**[0044]** Un sitio de unión a antígeno típico está compuesto por las regiones variables formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables de los anticuerpos es muy consistente y presenta estructuras muy similares. Estas regiones variables suelen estar compuestas por regiones marco (FR) relativamente homólogas entre las que se intercalan tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La actividad de unión global del fragmento de unión al antígeno suele venir dictada por la secuencia de las CDR. Los FR suelen desempeñar un papel en el posicionamiento y la alineación adecuados en tres dimensiones de las CDR para una unión óptima al antígeno. De hecho, dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que muestren las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertadas en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades distintas (véanse, por ejemplo, Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327, 1998; Jones, P. et al., Nature 321:522-525, 1986; y Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. USA 86:10029-10033, 1989). Dichas secuencias marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyan secuencias genéticas de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias genéticas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad que contiene mutaciones en todo el gen variable, pero normalmente agrupadas en las CDR. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción aminoterminal de la región marco 1 y en la porción carboxi-terminal de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo concreto para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original. Para ello, suele bastar con una secuencia parcial de cadenas pesadas y ligeras que abarque las regiones CDR. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué segmentos de genes variables y de genes de unión de la línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. A continuación, se utiliza la secuencia de la línea germinal para rellenar las partes que faltan de las regiones variables. Las secuencias líderes de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias que faltan, las secuencias de ADNc clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, se puede sintetizar toda la región variable para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas, como la eliminación o inclusión de determinados sitios de restricción o la optimización de determinados codones. Por supuesto, la totalidad o porciones de la región marco del anticuerpo aquí descrito pueden utilizarse junto con las CDR para optimizar la afinidad, especificidad o cualquier otra propiedad deseada del anticuerpo.

**[0045]** En algunos aspectos, la divulgación se refiere a polímeros tales como un polímero bifuncional. Un "polímero bifuncional", también denominado "enlazador bifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales capaces de reaccionar específicamente con otras moléculas para formar enlaces covalentes o no covalentes. Dichas moléculas pueden incluir, entre otros, los grupos laterales de aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contengan dichos aminoácidos naturales o no naturales. Las otras moléculas que pueden unirse al enlazador bifuncional o al polímero bifuncional pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Sólo a modo de ejemplo, un enlazador bifuncional puede tener un grupo funcional reactivo con un grupo de un primer péptido, y otro grupo funcional reactivo con un grupo

de un segundo péptido, formando así un conjugado que incluye el primer péptido, el enlazador bifuncional y el segundo péptido. Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para unir diversos compuestos a los péptidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea n.º 0188256; Patentes de EE.UU. N.º 4,659,839; 4,414,148; 4,699,784; 4,680,338, y 4,569,789. Un "polímero multifuncional", también denominado "enlazador multifuncional", es un polímero que comprende dos o más grupos funcionales capaces de reaccionar con otras moléculas. Dichas moléculas pueden incluir, entre otros, los grupos laterales de aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contengan dichos aminoácidos naturales o no naturales (incluidos, entre otros, los grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o multifuncional puede tener cualquier longitud o peso molecular deseado y puede seleccionarse para proporcionar un espaciado o conformación particular deseada entre una o más moléculas unidas a un compuesto y moléculas a las que se une, o al compuesto.

**[0046]** El término "biodisponibilidad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la velocidad y el grado en que una sustancia o su fracción activa se liberan de una forma farmacéutica y están disponibles en el lugar de acción o en la circulación general. Por aumento de la biodisponibilidad se entiende el incremento de la velocidad y el grado en que una sustancia o su fracción activa se liberan de una forma farmacéutica y están disponibles en el lugar de acción o en la circulación general. A modo de ejemplo, un aumento de la biodisponibilidad puede indicarse como un aumento de la concentración de la sustancia o de su fracción activa en la sangre en comparación con otras sustancias o fracciones activas.

**[0047]** El término "molécula biológicamente activa", "fracción biológicamente activa" o "agente biológicamente activo", cuando se utiliza en el presente documento, significa cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula, o interacción relacionada con un organismo, incluidos, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales, y seres humanos. En particular, tal como se utilizan en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, entre otras, cualquier sustancia destinada al diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o a mejorar de otro modo el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, fármacos duros, fármacos blandos, profármacos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con los métodos y composiciones aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, fármacos, profármacos, radionúclidos, agentes de imagen, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos y no esteroideos, toxinas derivadas de microbios, y similares.

**[0048]** Por "modular la actividad biológica" se entiende aumentar o disminuir la reactividad de un polipéptido, alterar la selectividad del polipéptido, aumentar o disminuir la selectividad de sustrato del polipéptido. El análisis de la actividad biológica modificada puede realizarse comparando la actividad biológica del polipéptido no natural con la del polipéptido natural.

**[0049]** En algunos aspectos, la divulgación se refiere a aminoácidos que se han incorporado biosintéticamente en el anticuerpo. El término "biosintéticamente", tal y como se utiliza aquí, se refiere a cualquier método que utilice un sistema de traducción (celular o no celular), incluyendo el uso de al menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un ARNt, y un ribosoma. A modo de ejemplo, los aminoácidos no naturales pueden "incorporarse biosintéticamente" a polipéptidos de aminoácidos no naturales utilizando los métodos y técnicas descritos en el presente documento y como es bien conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2010/011735 y WO2005/074650.

**[0050]** El término "variantes conservadoramente modificadas" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos naturales y no naturales como a secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y a combinaciones de las mismas. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, "variantes conservadoramente modificadas" se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos naturales y no naturales, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican una proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición donde una alanina está especificada por un codón, éste puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que constituyen una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Así, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácido nucleico natural o no natural que codifica un polipéptido natural o no natural describe también cada posible variación silenciosa del ácido nucleico natural o no natural. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón de un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita. En cuanto a las secuencias de aminoácidos, las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o suprime un único

aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de aminoácidos naturales y no naturales en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" cuando la alteración da lugar a la supresión de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido natural y no natural por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los expertos en la técnica conocen las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véanse, por ej., Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2.<sup>a</sup> edición, 1993). Dichas variantes conservadoramente modificadas se suman y no excluyen las variantes polimórficas, homólogas interespecíficas, y alelos de las composiciones descritas en el presente documento.

**[0051]** El término "fármaco", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier sustancia utilizada en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento, o cura de una enfermedad o afección como el cáncer, incluido el cáncer de próstata.

**[0052]** El término "cantidad eficaz", tal como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad suficiente de un agente, compuesto o composición administrada que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección tratada. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente, compuesto o composición que se administra incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, polipéptido de no aminoácido modificado, o un anticuerpo o variante del mismo. Las composiciones que contienen dichos polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, o un anticuerpo o variante de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. La cantidad "eficaz" adecuada en cada caso concreto puede determinarse mediante técnicas, como un estudio de escalado de dosis.

**[0053]** Los términos "potenciar" o "mejorar" significan aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración, un efecto deseado. A modo de ejemplo, "potenciar" el efecto de los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración, el efecto de los agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad eficaz potenciadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para potenciar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se utiliza en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante.

**[0054]** El término "anticuerpo humanizado o quimérico" se refiere a una molécula, generalmente preparada mediante técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana, (por ejemplo, murina), y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos/regiones marco (FR) son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores comprenderán esencialmente las mismas secuencias CDR de los anticuerpos de roedores parentales, aunque pueden incluirse ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado, o por otras razones. Sin embargo, como los intercambios de bucles CDR no dan lugar de manera uniforme a un anticuerpo con las mismas propiedades de unión que el anticuerpo de origen, en los anticuerpos humanizados también podrían introducirse cambios en los residuos marco (FR), residuos implicados en el soporte del bucle CDR, para preservar la afinidad de unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con dominios constantes o sólo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas de los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero sigue existiendo la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable extraña (LoBuglio, A. F. et al., "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:4220-4224, 1989). Otro enfoque se centra no sólo en proporcionar regiones constantes de origen humano, sino también en modificar las regiones variables para que se asemejen lo más posible a la forma humana. Se sabe que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie determinada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno concreto, las regiones variables pueden "humanizarse" injertando CDR derivadas del anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos ha sido informada por Kettleborough, C. A. et al., "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On

Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783,1991; Co, M. S. et al., "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:2869-2873,1991; Carter, P. et al., "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:4285-4289,1992; y Co, M. S. et al., "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154,1992. En algunos aspectos, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otros aspectos, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

**[0055]** El término "idéntico", tal como se utiliza aquí, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Además, el término "sustancialmente idénticas", tal como se utiliza aquí, se refiere a dos o más secuencias que tienen un porcentaje de unidades secuenciales que son las mismas cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada, tal como se mide utilizando algoritmos de comparación o por alineación manual e inspección visual. Sólo a modo de ejemplo, dos o más secuencias pueden ser "sustancialmente idénticas" si las unidades secuenciales son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente un 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región determinada. Estos porcentajes describen el "porcentaje de identidad" de dos o más secuencias. La identidad de una secuencia puede existir en una región que tenga al menos unas 75-100 unidades secuenciales de longitud, en una región que tenga unas 50 unidades secuenciales de longitud o, cuando no se especifique, en toda la secuencia. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Sólo a modo de ejemplo, dos o más secuencias polipeptídicas son idénticas cuando los residuos de aminoácidos son los mismos, mientras que dos o más secuencias polipeptídicas son "sustancialmente idénticas" si los residuos de aminoácidos son aproximadamente un 60% idénticos, aproximadamente un 65% idénticos, aproximadamente un 70% idénticos, aproximadamente un 75% idénticos, aproximadamente un 80% idénticos, aproximadamente un 85% idénticos, aproximadamente un 90% idénticos, o aproximadamente un 95% idénticos en una región específica. La identidad puede existir en una región que tenga al menos entre 75 y 100 aminoácidos de longitud, en una región que tenga unos 50 aminoácidos de longitud o, cuando no se especifique, en toda la secuencia de una secuencia polipeptídica. Además, sólo a modo de ejemplo, dos o más secuencias polinucleotídicas son idénticas cuando los residuos de ácido nucleico son los mismos, mientras que dos o más secuencias polinucleotídicas son "sustancialmente idénticas" si los residuos de ácido nucleico son aproximadamente un 60% idénticos, aproximadamente un 65% idénticos, aproximadamente un 70% idénticos, aproximadamente un 75% idénticos, aproximadamente un 80% idénticos, aproximadamente un 85% idénticos, aproximadamente un 90% idénticos, o aproximadamente un 95% idénticos en una región específica. La identidad puede existir en una región que tenga al menos entre 75 y 100 ácidos nucleicos de longitud, en una región que tenga unos 50 ácidos nucleicos de longitud o, cuando no se especifique, en toda la secuencia de una secuencia polinucleotídica.

**[0056]** El término "inmunogenicidad", tal como se utiliza aquí, se refiere a una respuesta de anticuerpos a la administración de un fármaco terapéutico. La inmunogenicidad frente a los polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos puede obtenerse mediante ensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos antipolipéptidos de aminoácidos no naturales en fluidos biológicos. Dichos ensayos incluyen, entre otros, el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo inmunoenzimático (ELISA), el inmunoensayo luminiscente (LIA), y el inmunoensayo fluorescente (FIA). El análisis de la inmunogenicidad frente a los polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos implica comparar la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos con la respuesta de anticuerpos tras la administración de polipéptidos de aminoácidos naturales terapéuticos.

**[0057]** El término "aislado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la separación y eliminación de un componente de interés de los componentes que no son de interés. Las sustancias aisladas pueden estar en estado seco o semiseco, o en solución, incluida, entre otras, una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede formar parte de una composición farmacéutica que comprenda portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad pueden determinarse mediante técnicas de química analítica que incluyen, entre otras, la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alta resolución. Además, cuando se aísla un componente de interés y es la especie predominante presente en un preparado, el componente se describe en el presente documento como sustancialmente purificado. El término "purificado", tal y como se utiliza aquí, puede referirse a un componente de interés con una pureza de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o superior. Sólo a modo de ejemplo, los ácidos nucleicos o las proteínas están "aislados" cuando dichos ácidos nucleicos o proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en estado natural, o que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado a un nivel superior a la concentración de su producción in vivo o in vitro. También, a modo de ejemplo, un gen se aísla cuando se separa de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés.

**[0058]** El término "enlace", tal como se utiliza en el presente documento para referirse a enlaces o fracción química formada a partir de una reacción química entre el grupo funcional de un enlazador y otra molécula. Dichos enlaces pueden incluir, pero no se limitan a, enlaces covalentes y enlaces no covalentes, mientras que dichas moléculas químicas pueden incluir, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, iminas, ésteres de fosfato, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos, y enlaces oligonucleotídicos. Por enlaces hidrolíticamente estables se entiende que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, incluyendo, pero sin limitarse a ello,

en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, quizás incluso indefinidamente. Por enlaces hidrolíticamente inestables o degradables se entiende que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluida, por ejemplo, la sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Sólo a modo de ejemplo, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en el esqueleto del polímero o en el grupo enlazador entre el esqueleto del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula polimérica. Dichos enlaces degradables incluyen, entre otros, enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos de PEG o ácidos carboxílicos de PEG activados con grupos alcohol de un agente biológicamente activo, en los que dichos grupos éster generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente biológicamente activo. Otros enlaces degradables hidrolíticamente incluyen, entre otros, enlaces carbonato; enlaces imina resultantes de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de la reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de la reacción de un formiato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluyendo pero no limitado a, en un extremo de un polímero como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidito, incluyendo pero no limitado a, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

**[0059]** El término "metabolito," como se usa aquí, se refiere a un derivado de un compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, o polipéptido de aminoácido no natural modificado, que se forma cuando el compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, o polipéptido de aminoácido no natural modificado, se metaboliza. El término "metabolito farmacéuticamente activo" o "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, por ejemplo un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o un polipéptido de aminoácido no natural modificado, que se forma cuando se metaboliza dicho compuesto, por ejemplo un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o un polipéptido de aminoácido no natural modificado.

**[0060]** El término "metabolizado", tal y como se utiliza aquí, se refiere a la suma de los procesos por los que una sustancia concreta es modificada por un organismo. Dichos procesos incluyen, entre otros, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas. Puede obtenerse más información sobre el metabolismo en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.<sup>a</sup> edición, McGraw-Hill (1996). A modo de ejemplo únicamente, los metabolitos de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden identificarse bien mediante la administración de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados a un huésped y el análisis de muestras de tejidos del huésped, o mediante la incubación de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados con células hepáticas in vitro y el análisis de los compuestos resultantes.

**[0061]** El término "modificado", tal como se utiliza aquí, se refiere a la presencia de un cambio en un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural, o un polipéptido de aminoácido no natural. Tales cambios, o modificaciones, pueden obtenerse por modificaciones post-síntesis de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales, o por modificación co-traducciona, o por modificación postraducciona de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales.

**[0062]** Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otros términos que pueden utilizarse como sinónimos del término "aminoácido no natural" son "aminoácido codificado de forma no natural", "aminoácido codificado no naturalmente", y sus versiones con y sin guion. El término "aminoácido no natural" incluye, entre otros, los aminoácidos que se producen de forma natural por modificación de un aminoácido codificado de forma natural (incluidos, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o la pirrolisina y la selenocisteína) pero que no son incorporados por sí mismos a una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de traducción. Algunos ejemplos de aminoácidos naturales que no están codificados de forma natural son, entre otros, la N-acetilglucosaminil-L-serina, la N-acetilglucosaminil-L-treonina, y la O-fosfotirosina. Además, el término "aminoácido no natural" incluye, entre otros, los aminoácidos que no se producen de forma natural y que pueden obtenerse sintéticamente o por modificación de aminoácidos no naturales.

**[0063]** El término "ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. Sólo a modo de ejemplo, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las de un ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, PNA (ácido peptidionucleico), análogos de ADN utilizados en la tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares); (iii) variantes de los mismos modificadas de forma conservadora (incluyendo, pero no limitándose a, sustituciones degeneradas de codones) y secuencias complementarias y secuencia explícitamente indicada. A modo de ejemplo, las

sustituciones degeneradas de codones pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o de todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

**[0064]** El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza aquí, se refiere a un material, incluyendo pero no limitado a una sal, aglutinante, adyuvante, excipiente, portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede ser administrado a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

**[0065]** En algunos aspectos, la divulgación se refiere a polímeros. El término "polímero", tal y como se utiliza aquí, se refiere a una molécula compuesta de subunidades repetidas. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos, o polisacáridos o polialquilenglicoles. Los polímeros de la divulgación pueden ser poliéter polioles poliméricos lineales o ramificados, incluidos, entre otros, el polietilenglicol, el polipropilenglicol, el polibutilenglicol, y sus derivados. Otros aspectos ejemplares figuran, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001). Sólo a modo de ejemplo, dichos polímeros tienen pesos moleculares medios comprendidos entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. Tales polímeros incluyen, pero no se limitan a, entre unos 100 Da y unos 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero no limitado a, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, y 100 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero oscila entre 100 Da y 50.000 Da aproximadamente. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del polímero está entre unos 10.000 Da y unos 40.000 Da. En algunos aspectos, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero sin limitarse a, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, y 1.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunos aspectos, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. En otros aspectos, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está comprendido entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da. Los términos "PEGilado" o "PEGilada" se refieren a la unión covalente del aminoácido sintético especificado a una molécula de polietilenglicol (PEG). El método puede comprender poner en contacto un polipéptido ADC  $\alpha$ -PSMA aislado que comprende un aminoácido sintético con un polímero soluble en agua que comprende una fracción que reacciona con el aminoácido sintético.

**[0066]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a la descripción de un péptido y a la descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican tanto a los polímeros de aminoácidos naturales como a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido no codificado naturalmente. Además, dichos "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa, en las que los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

**[0067]** El término "modificado postraduccionalmente" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce después de que dicho aminoácido se haya incorporado traslacionalmente a una cadena polipeptídica. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, modificaciones intraduccionales in vivo, modificaciones intraduccionales in vitro (como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones intraduccionales in vivo y modificaciones intraduccionales in vitro.

**[0068]** Los términos "profármaco" o "profármaco farmacéuticamente aceptable", tal como se utilizan aquí, se refieren a un agente que se convierte en el fármaco original in vivo o in vitro, que no anula la actividad biológica o las propiedades del fármaco, y que es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos

biológicos indeseables o interactuar de forma nociva con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido. Los profármacos son generalmente precursores de fármacos que, tras su administración a un sujeto y posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa mediante algún proceso, como la conversión por una vía metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad o alguna otra propiedad al fármaco. Una vez escindido y/o modificado el grupo químico del profármaco, se genera el fármaco activo. Los profármacos se convierten en fármaco activo en el organismo mediante reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar propiedades fisicoquímicas mejoradas, como una mejor solubilidad, características de administración mejoradas, como la orientación específica a una célula, tejido, órgano o ligando concretos, y un valor terapéutico mejorado del fármaco. Los beneficios de estos profármacos incluyen, entre otros, (i) facilidad de administración en comparación con el fármaco original; (ii) el profármaco puede ser biodisponible por administración oral, mientras que el original no lo es; y (iii) el profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco original. Un profármaco incluye un derivado farmacológicamente inactivo, o de actividad reducida, de un fármaco activo. Los profármacos pueden diseñarse para modular la cantidad de un fármaco o molécula biológicamente activa que alcanza un lugar de acción deseado mediante la manipulación de las propiedades de un fármaco, como las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas, o farmacocinéticas. Un ejemplo, sin limitación, de profármaco sería un polipéptido de aminoácido no natural que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad y que luego se hidroliza metabólicamente al ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Los profármacos pueden diseñarse como derivados reversibles de fármacos, para su uso como modificadores para mejorar el transporte de fármacos a tejidos específicos.

**[0069]** El término "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificado aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. En tales aplicaciones profilácticas, dichas cantidades pueden depender del estado de salud del paciente, su peso, y similares. Se considera bien dentro de la habilidad de la técnica para uno determinar tales cantidades profilácticamente eficaces por la experimentación rutinaria, incluyendo, pero no limitado a, un ensayo clínico de escalada de dosis.

**[0070]** El término "célula huésped recombinante", también denominado "célula huésped", se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en la que los métodos utilizados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, entre otros, la captación directa, la transducción, el apareamiento f, u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. Sólo a modo de ejemplo, dicho polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, incluyendo pero sin limitarse a un plásmido, o puede estar integrado en el genoma del huésped.

**[0071]** El término "sujeto", tal como se utiliza aquí, se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación o experimento. A modo de ejemplo únicamente, un sujeto puede ser, entre otros, un mamífero, incluido, entre otros, un ser humano.

**[0072]** El término "sustancialmente purificado", tal como se utiliza aquí, se refiere a un componente de interés que puede estar sustancial o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interactúan con el componente de interés antes de la purificación. Sólo a modo de ejemplo, un componente de interés puede estar "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de componentes contaminantes. Así, un componente de interés "sustancialmente purificado" puede tener un nivel de pureza de alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, alrededor del 95%, alrededor del 96%, alrededor del 97%, alrededor del 98%, alrededor del 99% o mayor. Sólo a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácidos naturales o un polipéptido de aminoácidos no naturales puede purificarse a partir de una célula nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales producidos recombinantemente. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácidos naturales o de un polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar "sustancialmente purificada" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácidos naturales o un polipéptido de aminoácidos no naturales es producido recombinantemente por células huésped, el polipéptido de aminoácidos naturales o el polipéptido de aminoácidos no naturales puede estar presente en aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, o aproximadamente 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural es producido recombinantemente por células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en el medio de cultivo en aproximadamente 5g/L, unos 4g/L, unos 3g/L, unos 2g/L, unos 1g/L, unos 750mg/L, unos 500mg/L, unos 250mg/L, unos 100mg/L, unos 50mg/L, unos 10mg/L, o unos 1mg/L o menos del peso

seco de las células. A modo de ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos naturales o los polipéptidos de aminoácidos no naturales "sustancialmente purificados" pueden tener un nivel de pureza de alrededor del 30%, alrededor del 35%, alrededor del 40%, alrededor del 45%, alrededor del 50%, alrededor del 55%, alrededor del 60%, alrededor del 65%, alrededor del 70%, alrededor del 75%, alrededor del 80%, alrededor del 85%, alrededor del 90%, alrededor del 95%, alrededor del 99% o superior, según se determine mediante métodos apropiados, incluidos, entre otros, el análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC, y electroforesis capilar.

**[0073]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza aquí, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural y/o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado administrado a un paciente que ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o al menos detener parcialmente, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La eficacia de tales composiciones depende de condiciones que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Sólo a modo de ejemplo, las cantidades terapéuticamente eficaces pueden determinarse mediante experimentación rutinaria, incluyendo pero no limitándose a un ensayo clínico de escalado de dosis.

**[0074]** El término "tóxico", o "fracción tóxica" o "grupo tóxico" o "citotóxico" o "carga útil citotóxica" o "carga útil", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que puede causar daño, alteraciones, o la muerte. Las moléculas tóxicas incluyen, pero no se limitan a, auristatina, agente de unión al surco menor del ADN, agente alquilante del surco menor del ADN, enedina, lexitropsina, duocarmicina, taxano, puromicina, dolastatina, maytansinoide, alcaloide de vinca, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maytansina, DM-1, netropsina, podofilotoxina (p. ej., etopósido, tenipósido, etc.), baccatina y sus derivados, agentes antitubulina, criptofisina, combretastatina, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotelona A, epotelona B, nocodazol, colchicinas, colcimid, estramustina, cemadotina, discodermolida, maytansina, eleuterobina, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, clorozotocina, mostaza uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromán, trietilenemelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, dacarbazina, y temozolomida, ytarabina, arabinósido de citosina, fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, pentostatina, 5-fluorouracilo, metotrexato, 10-propargil-5,8-dideazafolato, ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico, leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, deoxicofurmicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina, brequinar, antibióticos (por ej., antraciclina, gentamicina, cefalotina, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina, rocitromicina, furazolidona, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, flucloxacilina, meticilina, penicilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomina, rifabutina, etambutol, rifaximina, etc.), antivirales (p. ej., abacavir, aciclovir, ampligen, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, inmunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazona, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, estavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, etc.), clorhidrato de daunorrubicina, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarubicina, doxorrubicina, epirubicina y derivados morfolinicos, bisciclopéptidos de fenoxizona (por ejemplo, dactinomicina), glucopéptidos básicos (por ejemplo, bleomicina), glucósidos de antraquinona (por ejemplo, plicamicina, mitramicina), antracenos (por ejemplo, mitoxantrona), azirinopirrol indoleiones (por ejemplo, mitomicina), inmunosupresores macrocíclicos (por ejemplo, ciclosporina, FK-506, tacrolimus, prograf, rapamicina, etc.), navelbena, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, aloclolicina, Halicondrina B, colchicina, derivados de colchicina, maytansina, rizoxina, paclitaxel, derivados del paclitaxel, docetaxel, tiocolchicina, tritilcisterina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, cisplatino, carboplatino, hidroxietil, N-metilhidrazina, epidefilotoxina, procarbazona, mitoxantrona, leucovorina, y tegafur. "Taxanos" incluye paclitaxel, así como cualquier derivado activo de taxano o profármaco.

**[0075]** Los términos "tratar", "a tratar" o "tratamiento", tal y como se utilizan aquí, incluyen aliviar, prevenir, mitigar o mejorar los síntomas de una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, p. ej., detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección o detener los síntomas de la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos "tratar", "a tratar" o "tratamiento" incluyen, entre otros, los tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Los términos "tratar", "a tratar", o "tratamiento" pueden referirse a la disminución, reducción o mejora de uno o más síntomas asociados al cáncer de próstata.

**[0076]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que sea soluble en disolventes acuosos. Tales polímeros solubles en agua incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, mono alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o derivados ariloxi de los mismos (descritos en Patente de EE.UU N.º 5,252,714), monometoxipolietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, diviniléter anhídrido maleico, N-(2-Hidroxipropilo)-metacrilamida, dextrano, derivados del dextrano, incluido el sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioliol polioxiethylado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de la celulosa, incluyendo pero sin limitarse a metilcelulosa y carboximetilcelulosa, albúmina de suero, almidón y derivados del almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados del mismo, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados del mismo, polivinil étil éteres, y alfa-beta-poli[(2-

hidroxietilo)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Sólo a modo de ejemplo, el acoplamiento de dichos polímeros hidrosolubles a polipéptidos de aminoácidos naturales o a polipéptidos no naturales puede dar lugar a cambios que incluyen, entre otros, el aumento de la hidrosolubilidad, el aumento o la modulación de la semivida sérica, el aumento o la modulación de la semivida terapéutica en relación con la forma no modificada, el aumento de la biodisponibilidad, modulación de la actividad biológica, prolongación del tiempo de circulación, modulación de la inmunogenicidad, modulación de las características físicas de asociación, incluidas, entre otras, la agregación y la formación de multímeros, alteración de la unión al receptor, alteración de la unión a uno o más socios de unión, y alteración de la dimerización o multimerización del receptor. Además, dichos polímeros solubles en agua pueden tener o no actividad biológica propia.

[0077] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "semivida sérica modulada" se refiere a cambios positivos o negativos en la semivida circulante de una molécula biológicamente activa modificada en relación con su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, entre otras, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la semivida sérica se mide tomando muestras de sangre en distintos momentos tras la administración de la molécula biológicamente activa o de la molécula biológicamente activa modificada y determinando la concentración de dicha molécula en cada muestra. La correlación de la concentración sérica con el tiempo permite calcular la semivida sérica. A modo de ejemplo, la semivida sérica modulada puede ser un aumento de la semivida sérica, que puede permitir un régimen de dosificación mejorado o evitar efectos tóxicos. Dichos aumentos en el suero pueden ser de al menos unas dos veces, al menos unas tres veces, al menos unas cinco veces, o al menos unas diez veces. Los métodos para evaluar la semivida sérica son conocidos en la técnica y pueden utilizarse para evaluar la semivida sérica de los anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación.

[0078] El término "semivida terapéutica modulada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al cambio positivo o negativo en la semivida de la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biológicamente activa modificada, en relación con su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, entre otras, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la semivida terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en distintos momentos tras su administración. El aumento de la semivida terapéutica puede permitir un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evitar un efecto no deseado. A modo de ejemplo, el aumento de la semivida terapéutica puede deberse a un aumento de la potencia, a un aumento o disminución de la unión de la molécula modificada a su diana, a un aumento o disminución de otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada, o a un aumento o disminución de la descomposición de las moléculas por enzimas como, a modo de ejemplo únicamente, las proteasas. Los métodos para evaluar la semivida terapéutica son conocidos en la técnica y pueden utilizarse para evaluar la semivida terapéutica de los anticuerpos y conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0079] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación de la invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos proporcionados.

La Figura 1 muestra los estudios farmacocinéticos realizados en ratones con conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) anti-PSMA utilizando un MMAF no escindible, un MMAF escindible corto, un MMAF escindible y un MMAE escindible corto. F1 representa la detección del conjugado anticuerpo-fármaco en el suero por el anticuerpo. F3 representa la detección del conjugado anticuerpo-fármaco en el suero por el ligador del fármaco.

La Figura 2 muestra los estudios farmacocinéticos realizados en ratas con ADC anti-PSMA que muestran MMAF no escindible a varias concentraciones.

La Figura 3 muestra la comparación farmacocinética del anticuerpo anti-PSMA no conjugado (anticuerpo desnudo) comparado con ADC que utilizan MMAF no escindible.

Las Figuras 4A-4B muestran la respuesta de dosis única en el modelo de xenoinjerto de próstata C4-2 sobre el crecimiento tumoral (Figura 4A) y el cambio de peso corporal (Figura 4B) utilizando ADC anti-PSMA MMAF no escindible en varias dosis.

Las Figuras 5A-5B muestran la respuesta de dosis única en el modelo de xenoinjerto de próstata C4-2 sobre el crecimiento tumoral (Figura 5A) y el cambio de peso corporal (Figura 5B) utilizando ADC anti-PSMA MMAF escindible corto a varias dosis.

Las Figuras 6A-6B muestran los estudios farmacocinéticos en ratones portadores y no portadores de tumores (Figura 6A) y monos *Cynomolgus* (Figura 6B) tras una dosis única de ADC anti-PSMA utilizando MMAF no escindible.

Las Figuras 7A-7B muestran la respuesta a dosis repetidas en el modelo de xenoinjerto de próstata C4-2 sobre el crecimiento tumoral (Figura 7A) y el cambio de peso corporal (Figura 7B) utilizando MMAF no escindible en ADC anti-PSMA y MMAF no escindible en ADC anti-PSMA más enzalutamida a varias dosis.

Las Figuras 8A-8B muestran la respuesta a dosis repetidas en el modelo de próstata PDX sobre el crecimiento tumoral (Figura 8A) y el cambio de peso corporal (Figura 8B) utilizando MMAF no escindible en ADC anti-PSMA y MMAF no escindible en ADC anti-PSMA más enzalutamida a varias dosis.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

5 **[0080]** Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a metodologías particulares, o composiciones, o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente realizaciones concretas y no pretende ser limitativa. Tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares singulares "un/una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

10 **[0081]** Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones queden cubiertos por las mismas.

15 **[0082]** A menos que se defina de otro modo en el presente documento o en el resto de la especificación, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entienden las personas con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención.

20 **[0083]** Las terapias basadas en anticuerpos han surgido como componentes importantes de las terapias para un número creciente de tumores malignos humanos en campos como la oncología y las enfermedades inflamatorias e infecciosas. En la mayoría de los casos, la base de la función terapéutica es el alto grado de especificidad y afinidad que el fármaco basado en anticuerpos tiene por su antígeno diana. La combinación de anticuerpos monoclonales con fármacos, toxinas o radionucleidos es otra estrategia mediante la cual los anticuerpos monoclonales pueden inducir efectos terapéuticos. Al combinar la exquisita especificidad de los anticuerpos con el poder antitumoral de las moléculas efectoras tóxicas, los inmunoconjugados permiten distinguir con precisión entre el tejido diana y el normal, lo que reduce los efectos secundarios en comparación con la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales. Las toxinas utilizadas pueden conjugarse de forma específica, estable e irreversible con sitios únicos del anticuerpo. Este proceso único de conjugación permite controlar con precisión la localización de la toxina en el anticuerpo, así como el número de toxinas conjugadas con cada anticuerpo. Ambas características son fundamentales para controlar las características biofísicas y las toxicidades asociadas a los ADC. (Véanse, por ejemplo, Jackson et al., 2014, Tian et al., 2014).

30 **[0084]** Los conjugados anticuerpo-fármaco anti-PSMA proporcionados en la presente divulgación incluyen anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos y variantes que se unen al dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata. El antígeno de membrana específico de la próstata es una proteína de membrana de tipo II que se expresa altamente, por ejemplo, en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), los cánceres de próstata primarios y los cánceres de próstata metastásicos. El anticuerpo anti-PSMA aquí divulgado puede ser cualquier anticuerpo PSMA conocido con al menos un aminoácido codificado de forma no natural.

40 **[0085]** La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PSMA y variantes de los mismos que tienen un aminoácido codificado de forma no natural que facilita la conjugación del anticuerpo con un fármaco (por ejemplo, un fármaco, molécula de toxina). En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo anti-PSMA conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado no naturalmente en el anticuerpo. En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo anti-PSMA conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado de forma no natural en la cadena pesada del anticuerpo. En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo anti-PSMA conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado de forma no natural en la cadena ligera del anticuerpo. En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado naturalmente en el anticuerpo. En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado de forma no natural en la cadena pesada del anticuerpo. En un aspecto, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido codificado de forma no natural en la cadena ligera del anticuerpo. En la invención tal como se reivindica, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anticuerpo anti-PSMA) conjugado con un enlazador de fármaco, en el que la conjugación se produce a través de una para-acetil fenilalanina incorporada en la secuencia de cadena pesada, en el que el anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º 8 y la secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º 9, en la que se incorpora una paraacetil fenilalanina en la posición A114 de la cadena pesada según el esquema de numeración de Kabat.

60 **[0086]** En algunos aspectos, el fármaco del ADC es un fármaco o agente citotóxico. En algunos aspectos de la divulgación, el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enedina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maytansinoide, y un alcaloide de la vinca. En algunos aspectos de la divulgación, el fármaco citotóxico es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maytansina, DM-1, o netropsina, pero sin limitarse a ellos. En la invención tal como se reivindica, el enlazador del fármaco es un monometil auristatina F no escindible que tiene la estructura:

65



amina aromática, heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.). En algunos aspectos, dichos derivados tóxicos que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener funcionalidad adicional, incluyendo pero sin limitarse a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. En aspectos específicos, el grupo tóxico es un inhibidor de la tubulina. En ciertos aspectos específicos, el grupo tóxico es dolastatina o auristatina. En otros aspectos específicos, el grupo tóxico es dolastatina o derivado de auristatina. Nótese que las distintas funcionalidades mencionadas no implican que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá solapamientos en función de las circunstancias particulares. A modo de ejemplo únicamente, un polímero soluble en agua se solapa en su ámbito de aplicación con un derivado del polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

**[0093]** Ciertos aspectos de la presente divulgación describen preparaciones de ciertas moléculas tóxicas con enlazadores que reducen la toxicidad de la molécula in vivo mientras que la molécula tóxica retiene la actividad farmacológica. En algunos aspectos, la toxicidad del grupo tóxico enlazado, cuando se administra a un animal o humano, se reduce o elimina en comparación con el grupo tóxico libre o los derivados del grupo tóxico que comprenden enlaces lábiles, al tiempo que se conserva la actividad farmacológica. En algunos aspectos, se pueden administrar dosis mayores del grupo tóxico enlazado (por ejemplo, derivados del enlazador de dolastatina, derivados de dolastatina enlazados con aminoácidos no naturales) a animales o humanos con mayor seguridad. En ciertos aspectos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a una fracción tóxica (por ejemplo, un derivado de la dolastatina) proporcionan estabilidad in vitro y in vivo. En algunos aspectos, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a una fracción tóxica (por ejemplo, inhibidor de tubulina, derivado de dolastatina-10) son eficaces y menos tóxicos en comparación con la fracción tóxica libre (por ejemplo, inhibidor de tubulina, dolastatina-10).

#### Metodología y Técnicas

**[0094]** La presente divulgación abarca metodologías y tecnologías bien conocidas en la técnica. Estos incluyen métodos convencionales de espectroscopia de masas, NMR, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Los compuestos de la presente divulgación pueden sintetizarse utilizando varios procesos o esquemas empleados en la técnica. Véase, por ejemplo, Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 855-869, 2002; Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784, 2003; WO2012/166560; WO2013/185117. Numerosas metodologías y técnicas de síntesis de compuestos farmacéuticos, diagnósticos o terapéuticos son bien conocidas por los expertos en la técnica.

**[0095]** La presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, también abarca técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, todas ellas dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, como por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (Sambrook et al. Eds., 2001); *Oligonucleotide Synthesis: Methods And Applications (Methods in Molecular Biology)*, Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, M. J., Ed., 1984); *Methods In Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ; *Cell Biology: A Laboratory Notebook Academic Press*, New York, NY (Cellis, J. E., Ed., 1998); *Animal Cell Culture* (Freshney, R. I., Ed., 1987); *Introduction To Cell And Tissue Culture Plenum Press*, New York, NY, (Mather, J. P. and Roberts, P. E., Eds., 1998); *Cell And Tissue Culture: Laboratory Procedures John Wiley and Sons*, Hoboken, NJ, (Doyle, A. et al., Eds., 1993-8); *Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.)* New York, NY; *Weir's Handbook Of Experimental Immunology Wiley-Blackwell Publishers*, New York, NY, (Herzenberg, L. A. et al. Eds., 1997); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, NY, (Miller, J. M. et al. Eds., 1987); *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Pub. Associates, New York, NY, (Ausubel, F. M. et al., Eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser, Boston, MA, (Mullis, K. et al., Eds., 1994); *Current Protocols In Immunology*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, (Coligan, J. E. et al., eds., 1991); *Short Protocols In Molecular Biology*, Hoboken, NJ, (John Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology 7 Garland Science*, London, UK, (Janeway, C. A. et al., 2007); *Antibodies. Stride Publications*, Devoran, UK, (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach Oxford University Press*, USA, New York, NY, (D. Catty., ed., 1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach Oxford University Press*, USA, New York, NY, (Shepherd, P. et al. Eds., 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, (Harlow, E. et al. Eds., 1998); *The Antibodies Harwood Academic Publishers*, London, UK, (Zanetti, M. et al. Eds. 1995).

#### Derivados del Enlazador de la Dolastatina

**[0096]** En aspectos de la presente divulgación, pueden utilizarse derivados o análogos del enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, oxima, o hidroxilamina. Los métodos para seleccionar y diseñar un derivado del enlazador de dolastatina que se modificará utilizando los métodos, composiciones y técnicas son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo el documento WO2013/185117. El derivado del enlazador de la dolastatina puede diseñarse de novo, incluyendo sólo a modo de ejemplo, como parte de un proceso de cribado de alto rendimiento (en cuyo caso pueden diseñarse, sintetizarse, caracterizarse y/o probarse numerosos polipéptidos) o en función de los intereses del investigador. El nuevo derivado enlazador de dolastatina también puede diseñarse basándose en la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. Los principios para seleccionar qué aminoácido(s) sustituir y/o modificar y la elección de qué modificación

emplear se describen en el documento WO2013/185117, por ejemplo. El derivado del enlazador de dolastatina puede diseñarse para satisfacer las necesidades del experimentador o del usuario final. Dichas necesidades pueden incluir, entre otras, la manipulación de la eficacia terapéutica del polipéptido, la mejora del perfil de seguridad del polipéptido, el ajuste de la farmacocinética, farmacología y/o farmacodinámica del polipéptido, como, a modo de ejemplo únicamente, el aumento de la hidrosolubilidad, la biodisponibilidad, el aumento de la semivida sérica, el aumento de la semivida terapéutica, la modulación de la inmunogenicidad, la modulación de la actividad biológica, o la ampliación del tiempo de circulación. Además, dichas modificaciones incluyen, a modo de ejemplo únicamente, proporcionar funcionalidad adicional al polipéptido, incorporar un anticuerpo y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas. Tales derivados del enlazador de dolastatina pueden modificarse para contener un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo, o hidroxilamina. El derivado del enlazador de dolastatina puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o diez o más de un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, grupo hidroxilamina, o formas protegidas de los mismos. El derivado enlazador de dolastatina puede ser el mismo o diferente, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en el derivado que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más grupos reactivos diferentes.

**[0097]** Por ejemplo, los derivados de dolastatina con enlazadores que contienen un grupo hidroxilamina (también llamado aminooxi) permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados, incluyendo pero sin limitarse a, con PEG u otros polímeros solubles en agua. Al igual que las hidracinas, las hidrazidas y las semicarbazidas, la mayor nucleofilia del grupo aminooxi le permite reaccionar de forma eficaz y selectiva con una variedad de moléculas que contienen grupos carbonilo o dicarbonilo, incluidos, entre otros, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. (Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899, 1995; H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34(9): 727-736, 2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, una oxima, sin embargo, resulta generalmente de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo o dicarbonilo como, por ejemplo, una cetona, un aldehído u otros grupos funcionales con reactividad química similar. En algunos aspectos, los derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una azida, alquino o cicloalquino permiten enlazar moléculas mediante reacciones de cicloadición (por ejemplo, cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición de Huisgen azida-alquino, etc., descritas en Patente de EE. UU. N.º 7,807,619).

**[0098]** Por lo tanto, en ciertos aspectos descritos aquí se encuentran derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden un grupo hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidracina, amidina, imina, diamina, cetoamina, ceto-alquino, y ene-diona hidroxilamina, un grupo similar a la hidroxilamina (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo hidroxilamina), o un grupo hidroxilamina protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina tras la desprotección). En algunos aspectos, los derivados de dolastatina con enlazadores comprenden azidas, alquinos o cicloalquinos. En el presente documento y en los documentos WO2013/185117 y WO2005/074650 se incluyen ejemplos de este tipo de derivados del enlazador de dolastatina.

#### 40 Aminoácidos No Naturales

**[0099]** La selección de sitios de aminoácidos codificados no naturalmente se basó en la exposición a la superficie/accesibilidad al sitio dentro del anticuerpo y se seleccionaron sitios de aminoácidos hidrofóbicos o neutros para mantener la carga del anticuerpo. Los métodos para introducir aminoácidos no naturales insertados en sitios de una proteína se describen, por ejemplo, en WO2010/011735 y en WO2005/074650. La presente invención emplea tales metodologías y técnicas. Los aminoácidos no naturales utilizados en los métodos y composiciones aquí descritos tienen al menos una de las cuatro propiedades siguientes: (1) al menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural tiene al menos una característica y/o actividad y/o reactividad ortogonal a la reactividad química de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina), o al menos ortogonal a la reactividad química de los aminoácidos naturales presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes químicamente frente a los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de forma estable a un polipéptido, preferiblemente con la estabilidad acorde con los aminoácidos de origen natural o en condiciones fisiológicas típicas, y además preferiblemente dicha incorporación puede producirse mediante un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima reaccionando con un reactivo, preferiblemente en condiciones que no destruyan las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido no natural (a menos, por supuesto, que tal destrucción de las propiedades biológicas sea el propósito de la modificación/transformación), o cuando la transformación pueda ocurrir en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o cuando el sitio reactivo en el aminoácido no natural sea un sitio electrófilo. Se puede introducir en el polipéptido cualquier número de aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima tras la desprotección del grupo protegido o el desenmascaramiento del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que pueden transformarse en un grupo carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección del grupo protegido o el desenmascaramiento del grupo enmascarado y, por tanto, están disponibles para

reaccionar con hidroxilaminas u oximas para formar grupos oxima. Los aminoácidos no naturales a base de oxima pueden sintetizarse por métodos bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO2013/185117 y WO2005/074650), que incluyen: (a) reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con un reactivo que contiene carbonilo o dicarbonilo; (b) reacción de un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo con un reactivo que contiene hidroxilamina; o (c) reacción de un aminoácido no natural que contiene oxima con ciertos reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

**[0100]** Los aminoácidos no naturales que pueden usarse en los métodos y composiciones aquí descritos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan covalentemente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos glicosilados como una serina sustituida por azúcar, otros aminoácidos modificados por carbohidratos, aminoácidos que contienen cetoácidos, aminoácidos que contienen aldehídos, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos por átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotocleavables, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales, incluidos, entre otros, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluidos, entre otros, más de unos 5 o más de unos 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcares ligados al carbono, aminoácidos redox-activos, aminoácidos que contienen aminoácidos tioácidos, y aminoácidos que contienen una o más moléculas tóxicas.

**[0101]** En algunos aspectos, los aminoácidos no naturales comprenden una fracción de sacárido. Ejemplos de tales aminoácidos son la *N*-acetilo-L-glucosaminil-L-serina, la *N*-acetilo-L-galactosaminil-L-serina, la *N*-acetilo-L-glucosaminil-L-treonina, la *N*-acetilo-L-glucosaminil-L-asparagina y la *O*-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N- o O- natural entre el aminoácido y el sacárido se sustituye por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza - incluyendo, pero no limitado a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en las proteínas de origen natural, como la 2-deoxiglucosa, la 2-deoxigalactosa y similares.

**[0102]** Las moléculas químicas incorporadas a los polipéptidos mediante la incorporación de aminoácidos no naturales en dichos polipéptidos ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de los polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (incluido un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de una serie de reactivos que contienen hidracina o hidroxilamina *in vivo* y *in vitro*. Un aminoácido no natural de átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para desfasar datos de estructuras de rayos X. La introducción de átomos pesados en sitios específicos utilizando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad a la hora de elegir las posiciones de los átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluidos, entre otros, los aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazida, incluidas, entre otras, las cadenas laterales de fenilazida), por ejemplo, permiten el fotocruzamiento eficaz *in vivo* y *in vitro* de polipéptidos. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos son, entre otros, la *p*-azido-fenilalanina y la *p*-benzoil-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede entonces reticularse a voluntad mediante la excitación del grupo fotorreactivo, lo que proporciona un control temporal. En un ejemplo no limitante, el grupo metilo de un amino no natural puede ser sustituido con un grupo isotópicamente etiquetado, incluyendo pero no limitado a, con un grupo metilo, como una sonda de la estructura local y la dinámica, incluyendo pero no limitado a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

#### Derivados de la Dolastatina Unidos a Aminoácidos No Naturales

**[0103]** En otros aspectos de la presente divulgación se describen métodos, estrategias y técnicas para incorporar al menos un derivado del enlazador de dolastatina en un aminoácido no natural. La presente divulgación aquí descrita incluye métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar derivados del enlazador de dolastatina que contengan al menos uno de dichos aminoácidos no naturales. También se incluyen en este aspecto composiciones de y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar oligonucleótidos (incluyendo ADN y ARN) que pueden usarse para producir, al menos en parte, un derivado del enlazador de dolastatina que contenga al menos un aminoácido no natural. También se incluyen en este aspecto composiciones de y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar células que pueden expresar tales oligonucleótidos que pueden usarse para producir, al menos en parte, un derivado del enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural.

**[0104]** Así, se proporcionan y describen en el presente documento derivados del enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina. En ciertos aspectos, los derivados del enlazador de dolastatina con al menos un aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina incluyen al menos una modificación postraducciona en alguna posición del polipéptido. En algunos aspectos, la modificación cotraducciona o postraducciona se produce a través de la maquinaria celular (p. ej, glicosilación, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace glicolípido, y similares), en muchos casos, tales modificaciones cotraduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular se producen en los sitios de aminoácidos naturales del polipéptido; sin embargo, en ciertos aspectos, las modificaciones cotraduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular se producen en el sitio o sitios de aminoácidos no naturales del polipéptido.

**[0105]** En otros aspectos, la modificación postraduccional no utiliza la maquinaria celular, sino que la funcionalidad se proporciona mediante la unión de una molécula (un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos) que comprenda un segundo grupo reactivo al menos un aminoácido no natural que comprenda un primer grupo reactivo (incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos no naturales que contengan un grupo funcional cetona, aldehído, acetal, hemiacetal, alquino, cicloalquino, azida, oxima, o hidroxilamina) utilizando la metodología química descrita en el presente documento, u otras adecuadas para los grupos reactivos particulares. En ciertos aspectos, la modificación cotraduccional o postraduccional se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. En ciertos aspectos, la modificación postraduccional se realiza *in vitro* sin utilizar la maquinaria celular. También se incluyen en este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar dichos derivados del enlazador de dolastatina que contienen al menos uno de dichos aminoácidos no naturales modificados cotraduccional o postraduccionalmente.

**[0106]** También se incluyen dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas aquí descritas los reactivos capaces de reaccionar con un derivado del enlazador de dolastatina (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, alquino, cicloalquino, azida, grupo hidroxilamina, o formas enmascaradas o protegidas de los mismos) que forma parte de un polipéptido para producir cualquiera de las modificaciones postraduccionales antes mencionadas. En ciertos aspectos, el derivado del enlazador de dolastatina modificado postraduccionalmente resultante contendrá al menos un grupo oxima; el derivado del enlazador de dolastatina que contiene oxima modificada resultante puede someterse a reacciones de modificación posteriores. También se incluyen en este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar dichos reactivos que son capaces de realizar cualquiera de dichas modificaciones postraduccionales de dicho(s) derivado(s) del enlazador de dolastatina.

**[0107]** En ciertos aspectos, el polipéptido o derivado de dolastatina ligado a aminoácidos no naturales incluye al menos una modificación cotraduccional o postraduccional que se realiza *in vivo* por una célula huésped, donde la modificación postraduccional no se realiza normalmente por otro tipo de célula huésped. En ciertos aspectos, el polipéptido incluye al menos una modificación cotraduccional o postraduccional que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, donde la modificación cotraduccional o postraduccional no se realiza normalmente por una célula no eucariota. Ejemplos de tales modificaciones cotraduccionales o postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación lipídica, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace glicolipídico, y similares. En un aspecto, la modificación cotraduccional o postraduccional comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina mediante un enlace GlcNAc-asparagina (incluyendo, pero sin limitarse a, cuando el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)<sub>2</sub>-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otro aspecto, la modificación cotraduccional o postraduccional comprende la unión de un oligosacárido (incluyendo, entre otros, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina mediante un enlace GalNAc-serina, GalNAc-treonina, GlcNAc-serina, o GlcNAc-treonina. En ciertos aspectos, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta epitópica, una etiqueta FLAG, una etiqueta de polihistidina, una fusión GST, y/o similares. También se incluyen en este aspecto métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar dichos polipéptidos que contienen al menos una de dichas modificaciones cotraduccionales o postraduccionales. En otros aspectos, el polipéptido de aminoácido no natural glicosilado se produce en una forma no glicosilada. Dicha forma no glicosilada de un aminoácido no natural glicosilado puede producirse por métodos que incluyan la eliminación química o enzimática de grupos oligosacáridos de un polipéptido de aminoácido no natural glicosilado aislado o sustancialmente purificado o no purificado; la producción del aminoácido no natural en un hospedador que no glicosila dicho polipéptido de aminoácido no natural (dicho hospedador incluye, procariotas o eucariotas modificados o mutados para no glicosilar dicho polipéptido), la introducción de un inhibidor de la glicosilación en el medio de cultura celular en el que dicho polipéptido de aminoácido no natural está siendo producido por un eucariota que normalmente glicosilaría dicho polipéptido, o una combinación de cualquiera de estos métodos. También se describen en el presente documento dichas formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (por normalmente glicosilado se entiende un polipéptido que estaría glicosilado cuando se produce en condiciones en las que se glicosilan los polipéptidos naturales). Por supuesto, dichas formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (o, de hecho, cualquier polipéptido descrito en el presente documento) pueden estar en una forma no purificada, en una forma sustancialmente purificada o en una forma aislada.

#### Derivados de Dolastatina Enlazados que Contienen Oxima

**[0108]** Los derivados de aminoácidos no naturales vinculados a la dolastatina que contienen un grupo oxima permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos carbonilo o dicarbonilo reactivos (incluidos, entre otros, cetonas, aldehídos u otros grupos con reactividad similar) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Dicha reacción de intercambio de oxima permite la posterior funcionalización de los derivados enlazados de dolastatina. Además, el derivado original enlazado de dolastatina que contiene un grupo oxima puede ser útil por derecho propio siempre que el enlace oxima sea estable en las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, los métodos sintéticos *in vivo*, *in vitro* y químicos descritos en el presente documento y en los documentos WO2013/185117 y WO2005/074650).

**[0109]** Por lo tanto, en ciertos aspectos descritos en el presente documento hay derivados de aminoácidos no naturales unidos a dolastatina con cadenas laterales que comprenden un grupo oxima, un grupo similar a oxima (que tiene reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo oxima enmascarado (que

se puede convertir fácilmente en un grupo oxima), o un grupo oxima protegido (que tiene reactividad similar a un grupo oxima después de la desprotección).

5 **[0110]** Los métodos y composiciones para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un derivado enlazador de dolastatina son bien conocidos en la técnica, (ver por ejemplo WO2013/185117 y WO2005/074650). Pueden incorporarse uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones particulares que no interrumpan la actividad del derivado enlazador de dolastatina. Esto puede lograrse haciendo sustituciones "conservadoras", que incluyen, entre otras, la sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófobos no naturales o naturales, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos no naturales o naturales, aminoácidos hidrófilos por aminoácidos hidrófilos no naturales o naturales) y/o insertando el aminoácido no natural en un lugar que no sea necesario para la actividad.

15 **[0111]** Se puede emplear una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del derivado enlazador de dolastatina. En algunos aspectos, el aminoácido no natural está unido en el C-terminal del derivado de dolastatina. En otros aspectos, el aminoácido no natural está unido en el N-terminal del derivado de dolastatina. Cualquier posición del derivado del enlazador de dolastatina es adecuada para la selección para incorporar un aminoácido no natural, y la selección puede basarse en un diseño racional o por selección aleatoria para cualquier o ningún propósito deseado en particular. La selección de los sitios deseados puede basarse en la producción de un polipéptido de aminoácidos no naturales (que puede modificarse aún más o permanecer sin modificar) que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo pero sin limitarse a moduladores de la unión a receptores, moduladores de la actividad de receptores, moduladores de la unión a socios de unión, moduladores de la actividad de la pareja de unión, moduladores de la conformación de la pareja de unión, formación de dímeros o multímeros, ningún cambio en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido como solubilidad, agregación, o estabilidad. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente realizar sustituciones en serie en cada posición de la cadena polipeptídica con un aminoácido no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Cualquier medio, técnica, o método para seleccionar una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en los métodos, técnicas y composiciones aquí descritos.

20 **[0112]** La estructura y la actividad de mutantes naturales de un polipéptido que contienen deleciones también pueden examinarse para determinar las regiones de la proteína que probablemente sean tolerantes a la sustitución por un aminoácido no natural. Una vez eliminados los residuos que probablemente sean intolerantes a la sustitución por aminoácidos no naturales, puede examinarse el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes utilizando métodos que incluyan, entre otros, la estructura tridimensional del polipéptido en cuestión, y cualquier ligando o proteína de unión asociados. Las estructuras cristalográficas de rayos X y de NMR de muchos polipéptidos están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, véase rcsb.org en la World Wide Web), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de grandes moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, y que puede utilizarse para identificar posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse por aminoácidos no naturales. Además, pueden hacerse modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no se dispone de datos estructurales tridimensionales. De este modo, puede obtenerse fácilmente la identidad de las posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse por aminoácidos no naturales.

35 **[0113]** Los sitios ejemplares de incorporación de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están excluidos de las regiones de unión a receptores potenciales, o las regiones de unión a proteínas de unión o ligandos pueden estar total o parcialmente expuestas a disolventes, tener interacciones de enlace de hidrógeno mínimas o nulas con residuos cercanos, pueden estar mínimamente expuestas a residuos reactivos cercanos, y/o pueden estar en regiones que son altamente flexibles según lo predicho por la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido particular con su receptor asociado, ligando o proteínas de unión.

40 **[0114]** Una amplia variedad de aminoácidos no naturales pueden sustituirse o incorporarse en una posición determinada de un polipéptido. A modo de ejemplo, puede seleccionarse un aminoácido no natural concreto para su incorporación basándose en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido con su ligando asociado, receptor y/o proteínas de unión, una preferencia por las sustituciones conservadoras.

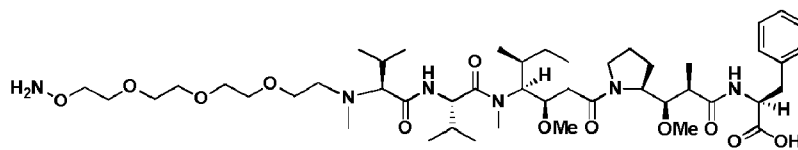
45 **[0115]** En un aspecto, los métodos aquí descritos incluyen la incorporación en el derivado enlazador de dolastatina, donde el derivado enlazador de dolastatina comprende un primer grupo reactivo; y el contacto del derivado enlazador de dolastatina con una molécula (incluyendo pero no limitado a una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo. En ciertos aspectos, el primer grupo reactivo es una fracción de hidroxilamina y el segundo grupo reactivo es una fracción de carbonilo o dicarbonilo, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertos aspectos, el primer grupo reactivo es una fracción de carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es una fracción de hidroxilamina, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertos aspectos, el primer grupo reactivo es una fracción de carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es una fracción de oxima, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima. En ciertos aspectos, el primer grupo reactivo es una fracción de oxima y el segundo grupo reactivo es una fracción de carbonilo o dicarbonilo, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima.

[0116] En algunos casos, la(s) incorporación(es) del derivado enlazador de dolastatina se combinará(n) con otras adiciones, sustituciones o supresiones dentro del polipéptido para afectar otros rasgos químicos, físicos, farmacológicos y/o biológicos. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o aumentar la afinidad del polipéptido por su receptor apropiado, ligando y/o proteínas de unión. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo, pero sin limitarse a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido. En algunos aspectos se seleccionan sitios para la sustitución con un aminoácido codificado naturalmente o no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural con el fin de aumentar la solubilidad del polipéptido tras la expresión en *E. coli*, u otras células huésped recombinantes. En algunos aspectos, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución, o delección que modula la afinidad por el ligando asociado, las proteínas de unión y/o el receptor, modula (incluyendo pero sin limitarse a, aumenta o disminuye) la dimerización del receptor, estabiliza los dímeros del receptor, modula la semivida circulante, modula la liberación o biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una vía de administración particular. Del mismo modo, el polipéptido de aminoácidos no naturales puede incluir secuencias químicas o de escisión enzimática, secuencias de escisión por proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (incluidos, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en la afinidad (incluidos, entre otros, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas enlazadas (incluida, entre otras, la biotina) que mejoren la detección (incluida, entre otras, la GFP), la purificación, el transporte a través de tejidos o membranas celulares, la liberación o activación de profármacos, la reducción de tamaño, u otras características del polipéptido.

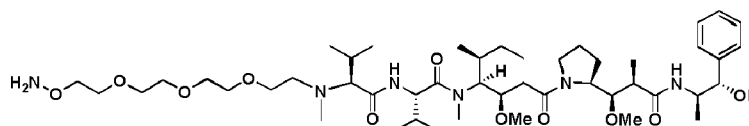
[0117] En algunos aspectos, se emplea una carga útil o una fracción de toxina en los conjugados farmacológicos de anticuerpos anti PSMA de la presente divulgación: Inhibidores de la replicación del ADN, inhibidores de la transcripción del ADN, inhibidores de la traducción del ARN, inhibidores de la división celular, inhibidores de la señalización celular, inhibidores de la quinasa, inhibidores de la tubulina polimerasa, agentes despolimerizadores de la tubulina, agentes de escisión del ADN, agentes de unión del ADN, inhibidores de la ARN polimerasa, auristatinas, dolastatinas, MMAF, MMAE, MMAD, análogos de la duocarmicina, análogos de la pirrolbenzodiazepina (PBD), análogos de la tubulisina, análogos de la maytansina, análogos de la amanitina, análogos de la criptoficina, análogos de la epothilona, análogos de la calicheamicina, análogos de la doxorubicina, análogos de la camptotecina.

[0118] En otros aspectos de la presente divulgación se proporcionan enlazadores de carga útil de fármacos. Se eligieron inhibidores de la tubulina como carga útil en combinación con enlazadores escindibles, escindibles cortos y no escindibles. De manera ejemplar, la combinación de enlazador de carga útil de la presente divulgación puede incluir, pero no se limita a, enlazadores de carga útil escindibles, no escindibles, escindibles cortos. Los enlazadores de carga útil escindibles pueden incluir dipéptidos escindibles (incluidos, entre otros, Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys y Ala-Ala), enlace hidracina, enlace disulfuro o enlace pirofosfato. Ejemplos de enlazadores de carga útil empleados en el conjugado anticuerpo-fármaco anti-PSMA de la presente divulgación incluyen MMAE no escindible, MMAF no escindible, Val-Citrulina-Acetilo MMAF corto, o Val-Citrulina-Acetilo MMAE corto. En el estudio se utilizaron tanto MMAE como MMAF. Ejemplos no limitantes de derivados del enlazador de dolastatina incluyen los siguientes:

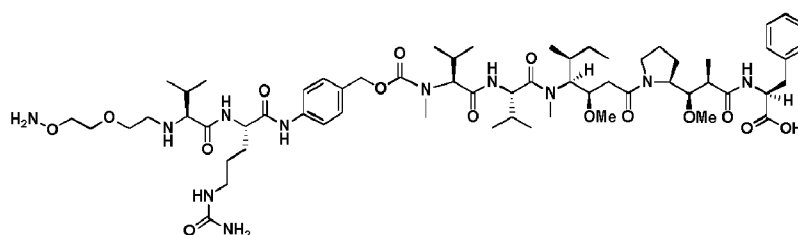
MMAF no escindible que tiene la estructura:



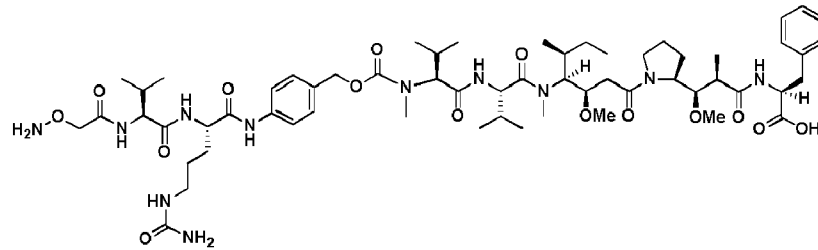
MMAE (Monomethyl auristatin E) no escindible que tiene la estructura:



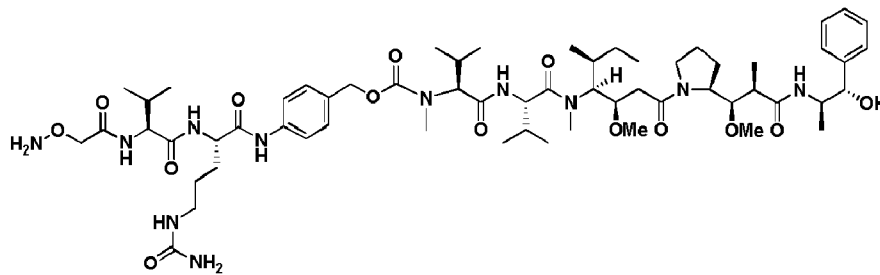
Escindible o Val-Citrulina-Acetilo (Val-Cit) MMAF que tiene la estructura:



MMAF escindible corto o corto Val-Citrulina-Acetilo (Val-Cit) que tiene la estructura:



MMAE escindible corto o corto Val-Citrulina-Acetilo (Val-Cit) que tiene la estructura:

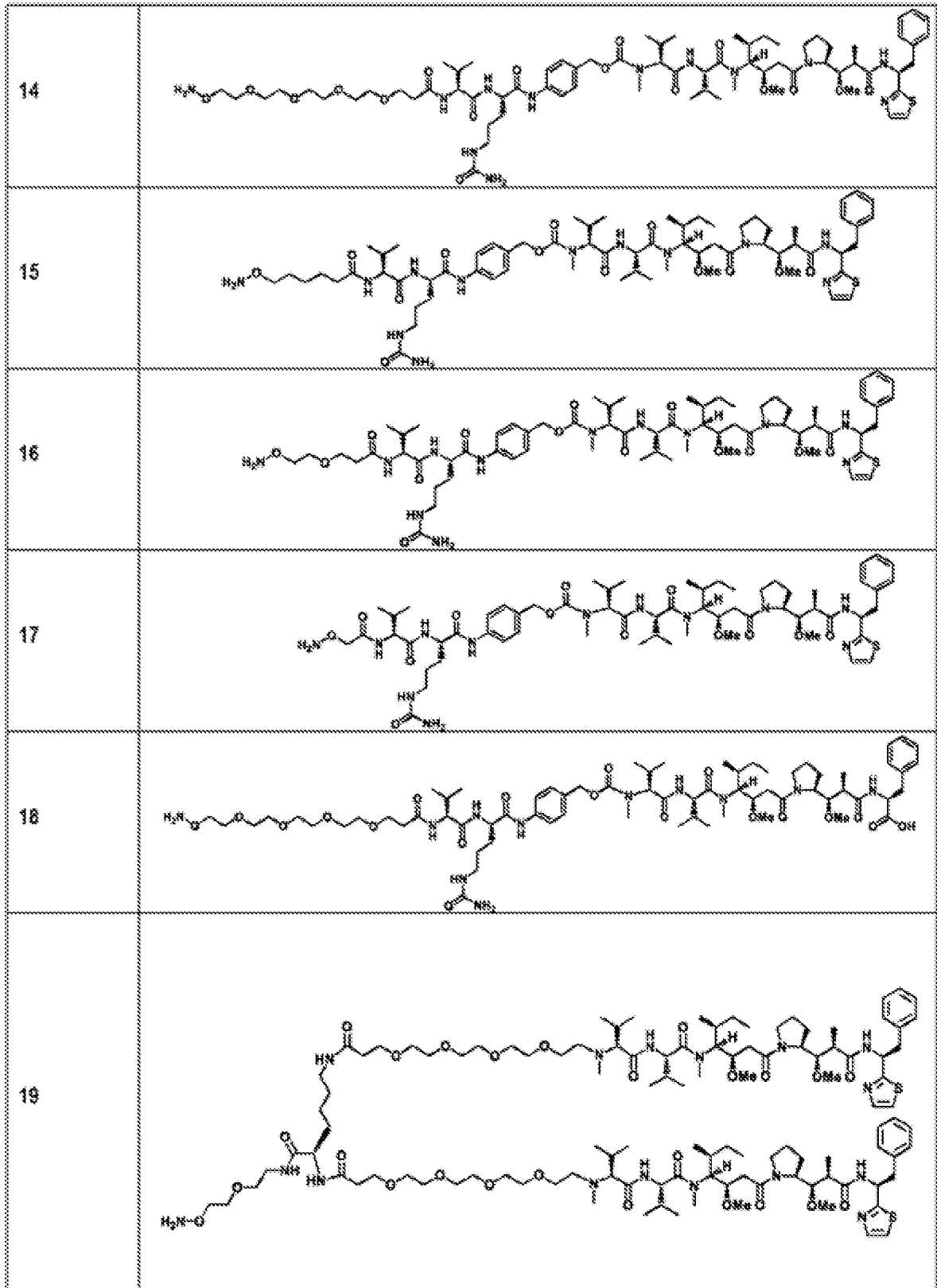


[0119] La Tabla 1 proporciona compuestos enlazadores de fármacos que pueden emplearse con el anticuerpo anti PSMA o los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación. La síntesis de dichos enlazadores de carga útil es bien conocida por el artesano experto. Véase, por ejemplo, Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 855-869, (2002); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784, (2003); WO2012/166560; WO2013/185117.





(continuación)



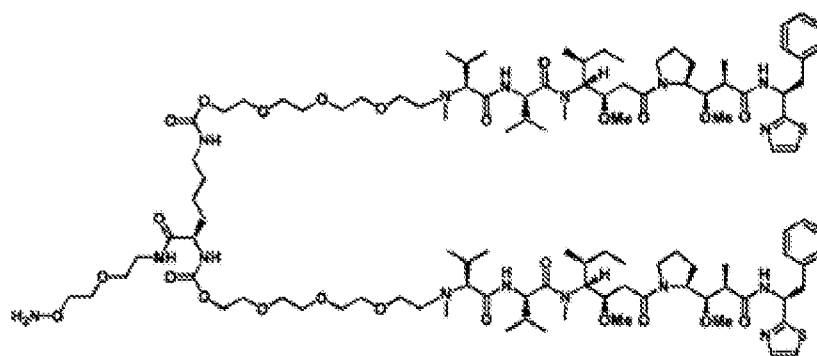
(continuación)

5

10

15

20



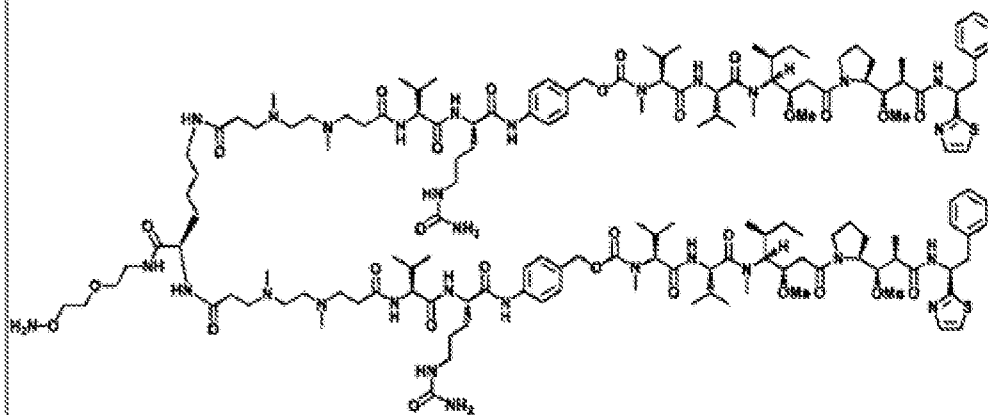
20

25

30

35

21

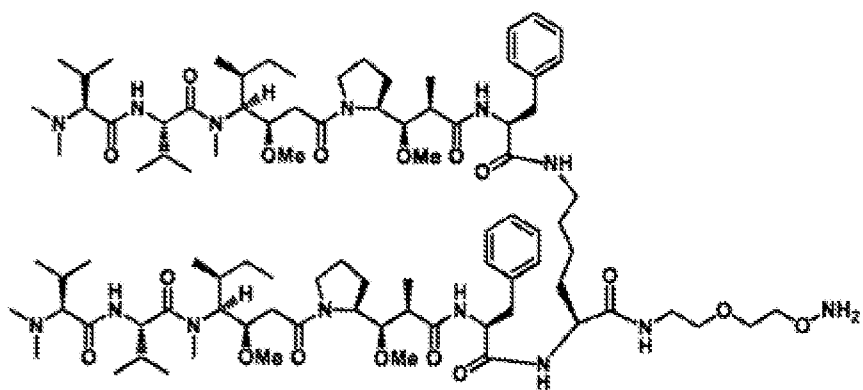


40

45

50

22

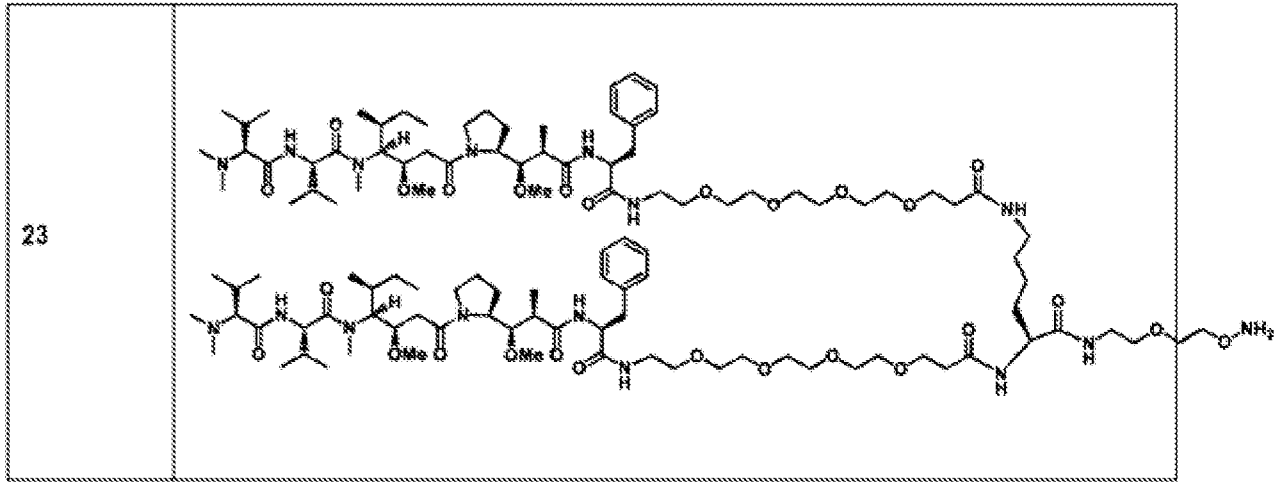


55

60

65

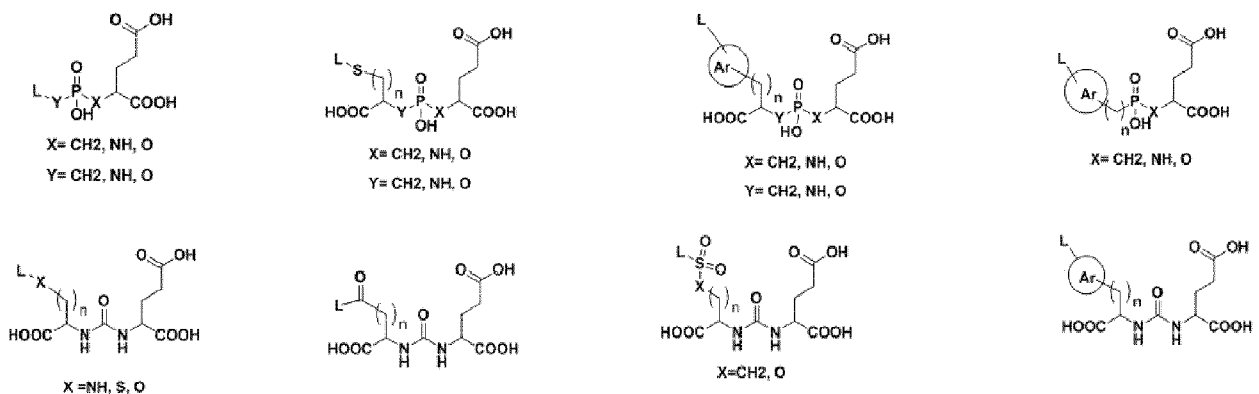
(continuación)

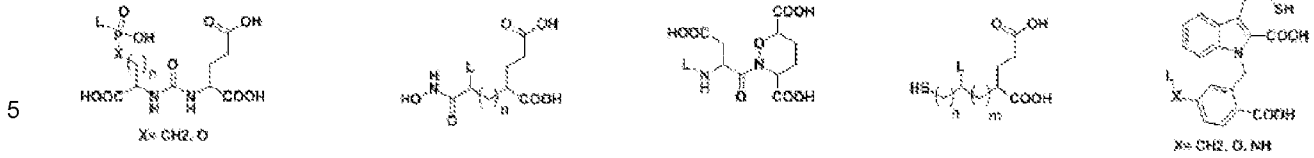


Generación de ADC anti-PSMA conjugado con ligando dirigido a PSMA

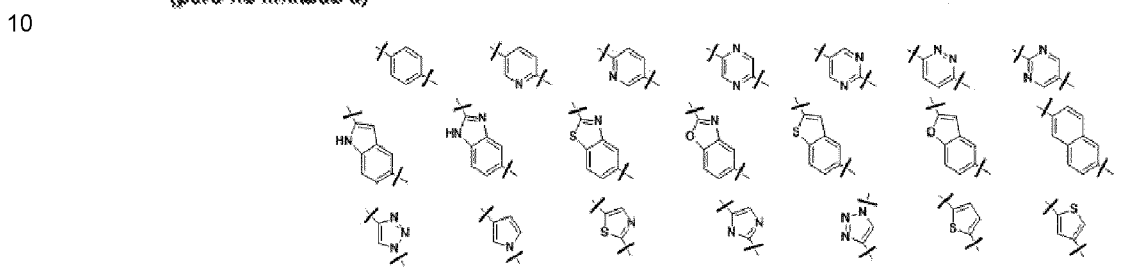
[0120] En otros aspectos de la divulgación se incluyen ligandos diana. Dichos ligandos incluyen los que se unen al sitio activo del receptor PSMA, los ligandos que son inhibidores de la actividad enzimática de la glutamato carboxipeptidasa del receptor PSMA, y los ligandos utilizados para la obtención de imágenes. La divulgación también incluye aquellos ligandos con un rango de afinidad de unión sub-pico a sub-nano molar.

[0121] Los ADC anti-PSMA conjugados con el ligando diana de PSMA pueden generarse como se describe en el presente documento. Un método de generación implica la conjugación secuencial en la que el enlazador de toxinas se conjuga con el anticuerpo mediante el método de conjugación de cisteína-maleimida seguido de la conjugación del ligando PSMA-objetivo en sitios específicos del anticuerpo basado en el método de ligación de oxima patentado. La conjugación con maleimida se realiza mediante la reducción de los puentes disulfuro entre las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, facilitada por la adición de los agentes reductores pertinentes. Los enlaces disulfuro del anticuerpo pueden reducirse incubando una mezcla de reacción formulada con un pH comprendido entre 6 y 7,4 consistente en anticuerpo y un agente reductor de 3 a 9 veces molar superior. La mezcla de reacción puede incubarse a 37°C durante 2 h para obtener una proporción fármaco:anticuerpo de 3 a 4. A continuación, el anticuerpo conjugado con la toxina se transfiere a una mezcla de reacción con un pH comprendido entre 4 y 5 que contiene un ligando dirigido a PSMA 10 veces molar superior. La reacción del anticuerpo conjugado con la toxina con el ligando dirigido a PSMA puede realizarse incubando a temperatura ambiente con agitación suave durante 8 a 16 horas. Por lo general, la cantidad de PSMA ligando de orientación a la gama de anticuerpos entre 1,8 y 2 generados por este método. Los componentes no conjugados de la mezcla de reacción se eliminan pasando por una columna de intercambio catiónico y se intercambian en un tampón de formulación propia que es isotónico con los fluidos corporales del ratón y del ser humano. En otro método, el ligando dirigido a PSMA y la toxina pueden conjugarse en sitios específicos del anticuerpo en un solo paso mediante química de conjugación basada en oxima. Esta conjugación de un solo paso puede facilitarse diseñando un enlazador ramificado que contenga tanto el ligando de PSMA como la toxina. La conjugación en un solo paso puede realizarse mediante química de clic propia basada en oxima y ciclo-octileno. Los componentes no conjugados pueden eliminarse de la mezcla de reacción pasándolos por una columna de purificación de intercambio catiónico. A continuación, el material purificado se formula en un tampón isotónico. En aspectos ejemplares los ligandos dirigidos a PSMA, (L representa un enlazador), incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:





Ar: puede ser cualquiera de los anillos aromáticos de 5, 6 miembros o anillos aromáticos fusionados, tal como (pero no limitado a)



15 **[0122]** En aspectos ejemplares, los ligandos PSMA de la presente divulgación pueden incluir aquellos compuestos que tienen un ligando diana N-terminal y una porción o parte de conjugación C-terminal. En otros aspectos ejemplares de la presente divulgación, los ligandos dirigidos a PSMA pueden incluir los siguientes (Tabla 2), pero no se limitan a los mismos:

Tabla 2. Ligandos Diana

20

Ejemplo	Estructura
1	

25

30

35

40

45

50

55

60



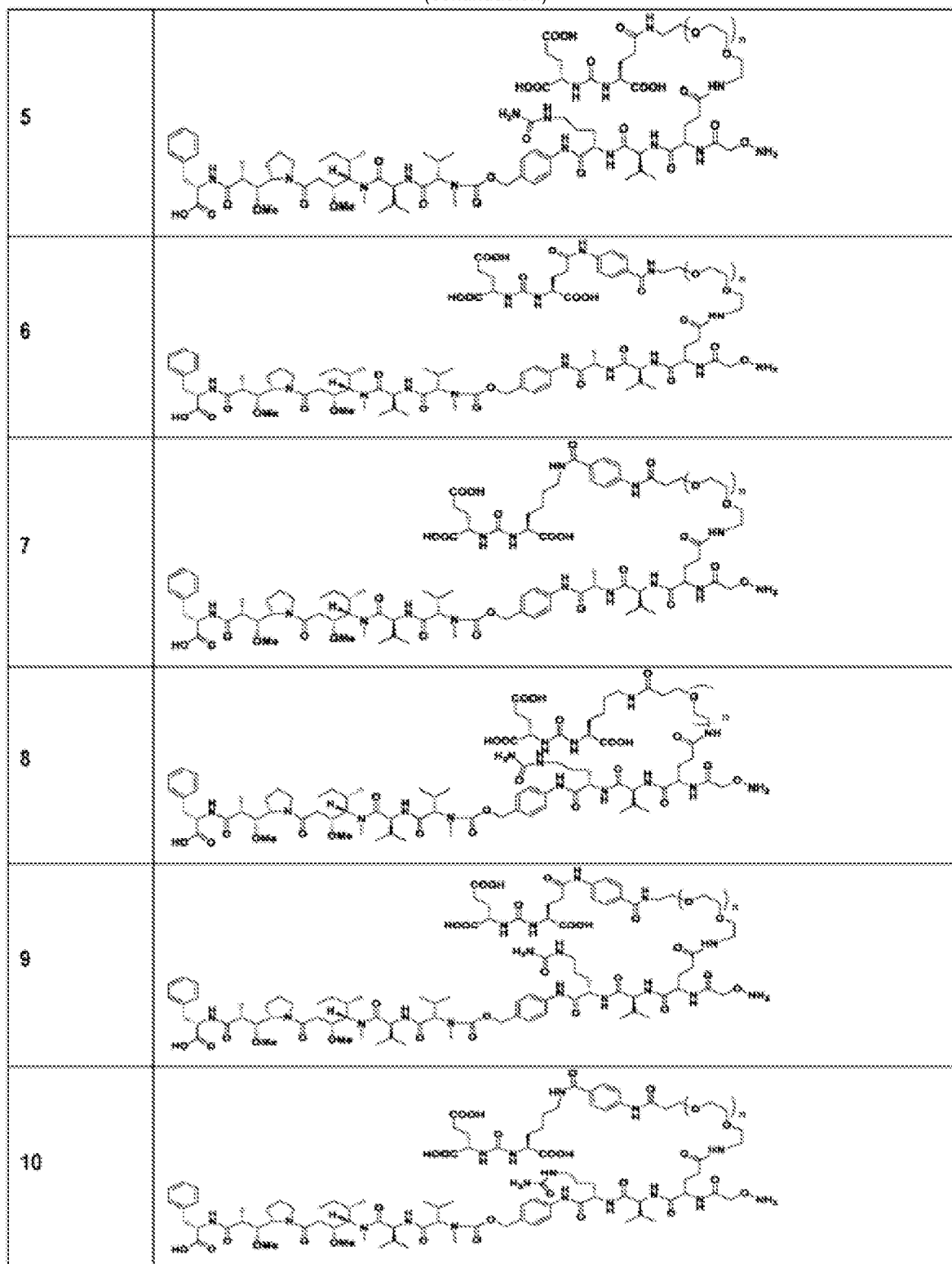
[0124] En otros aspectos de la presente divulgación, el enlazador puede ser, de manera no limitativa, polietilenglicol (PEG), alquilo, alqueno, alquino, amina, arilo, o aminoácidos. La química, la metodología y las técnicas para conectar enlazadores son bien conocidas en la técnica.

[0125] En otro aspecto ejemplar, la presente divulgación incluye ligandos dirigidos a PSMA con toxinas (Tabla 3) que incluyen, pero no se limitan a:

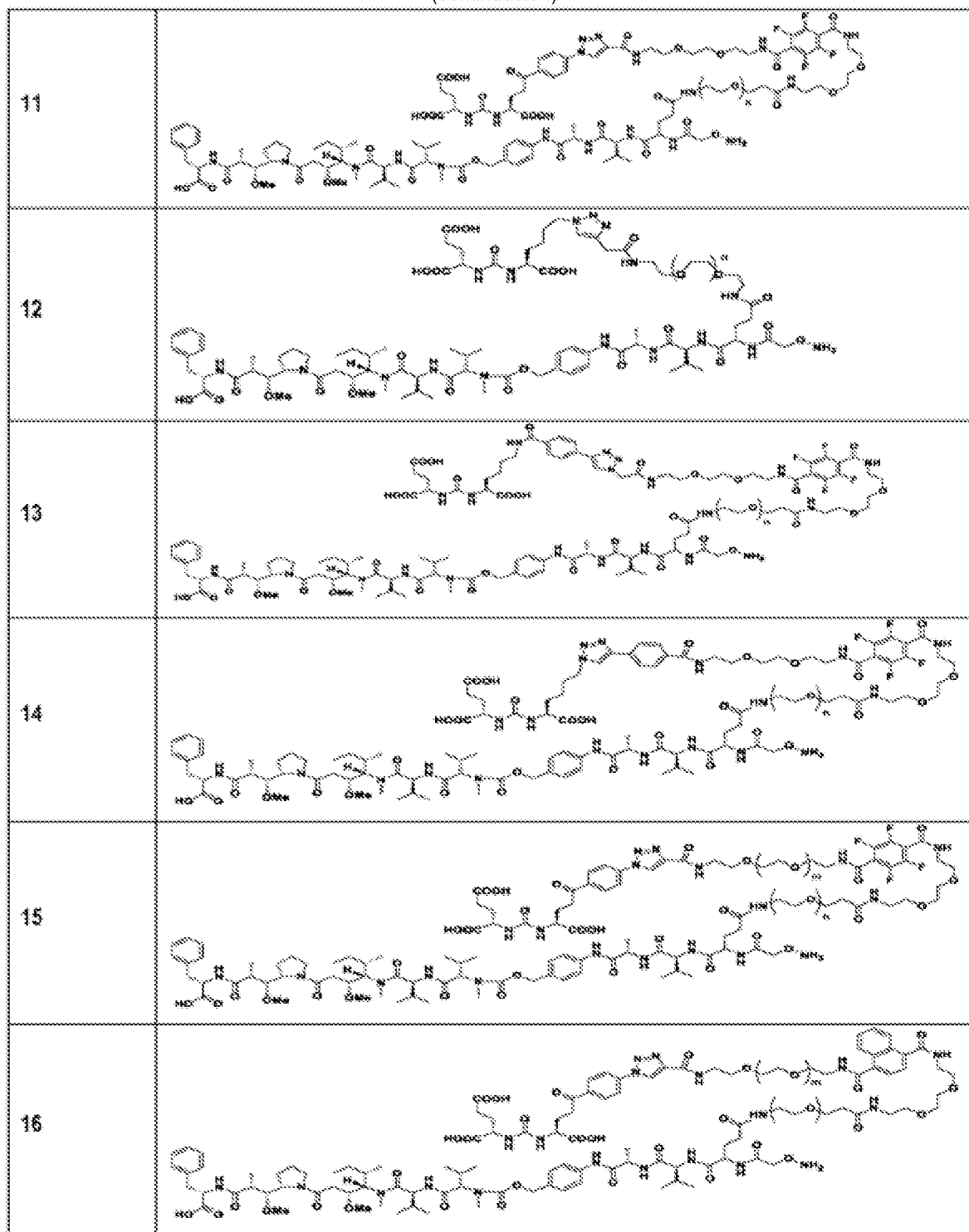
Tabla 3. Ligandos-Toxinas

Ejemplo	Estructura
1	
2	
3	
4	

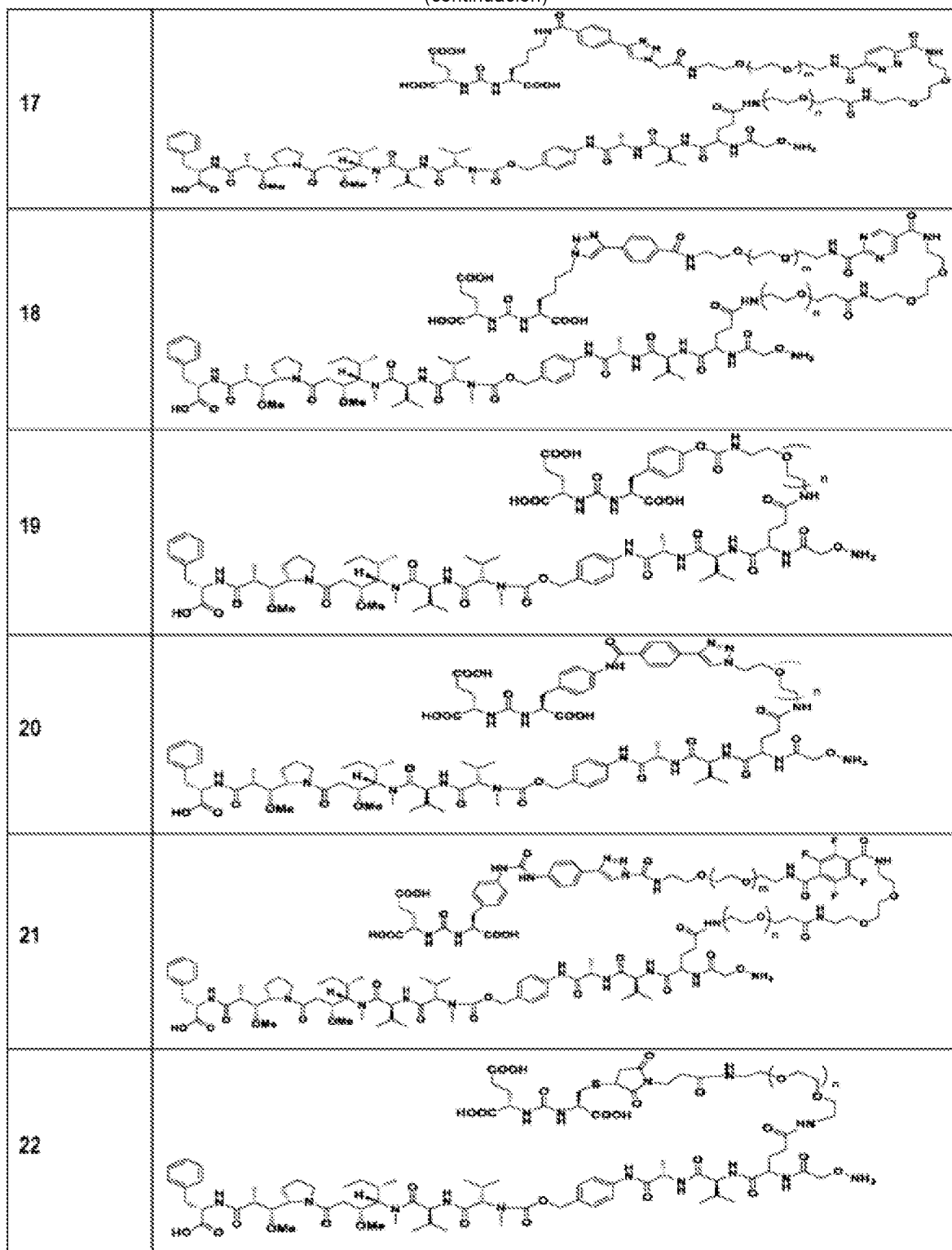
(continuación)



(continuación)



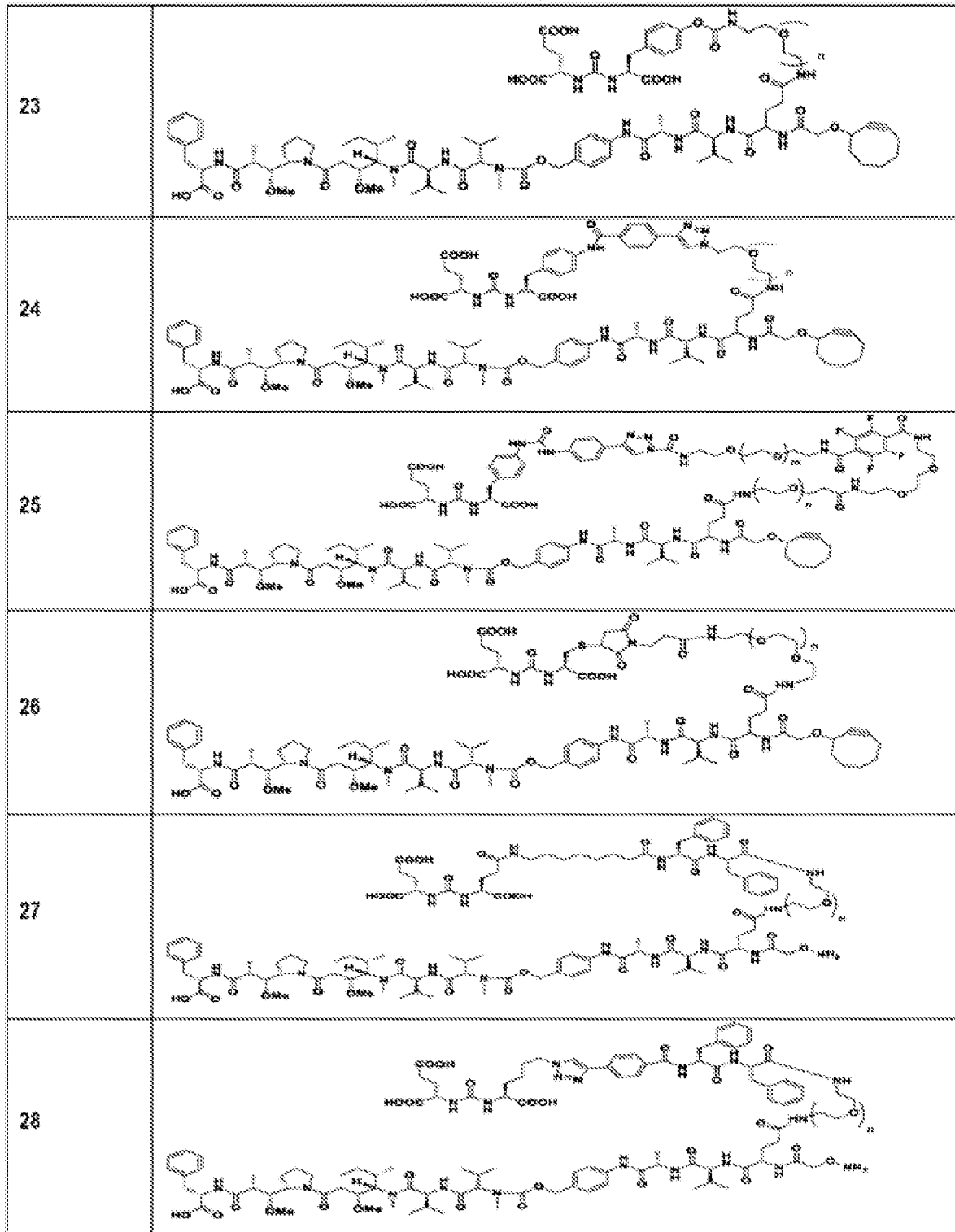
(continuación)



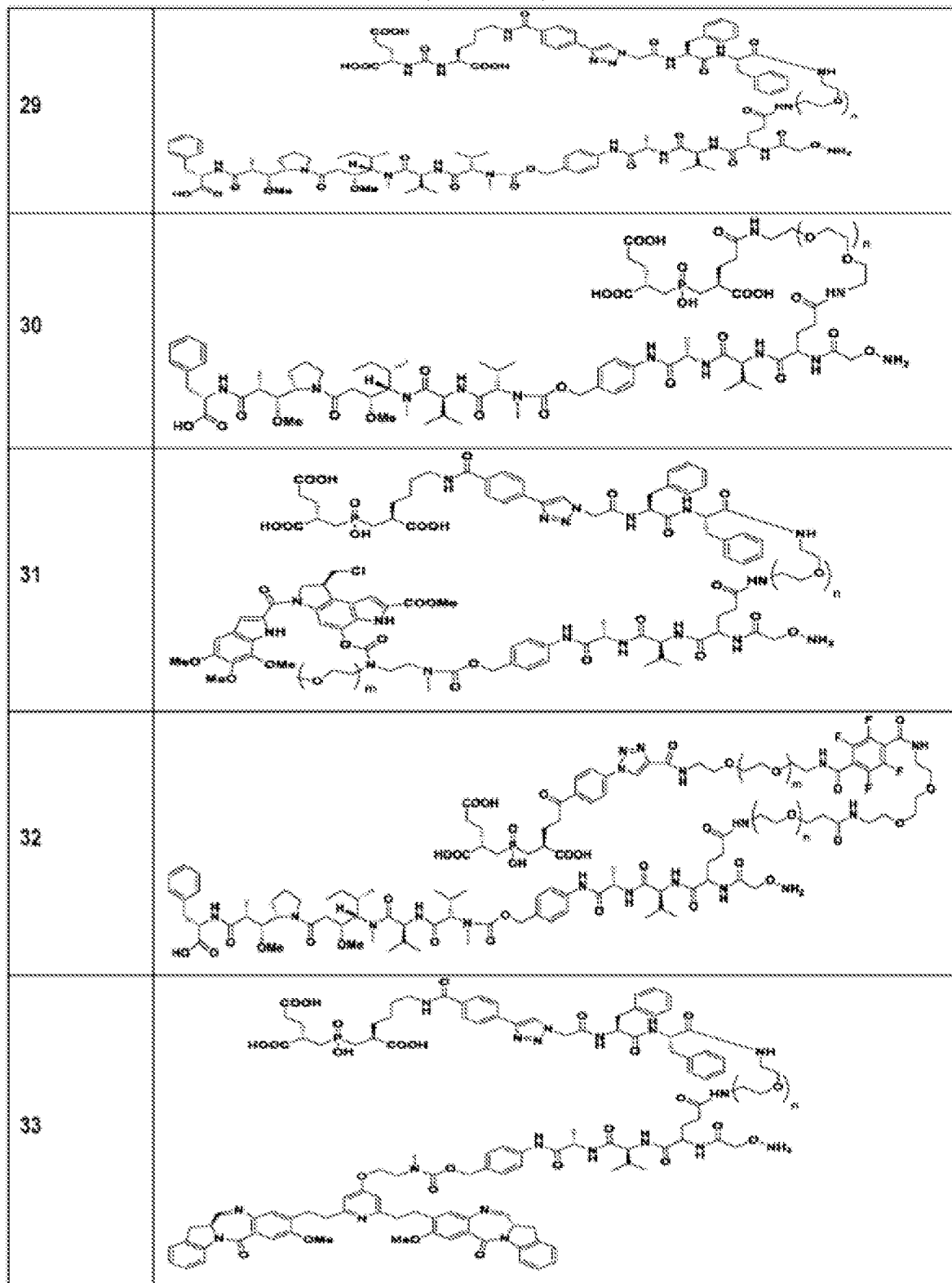
60

65

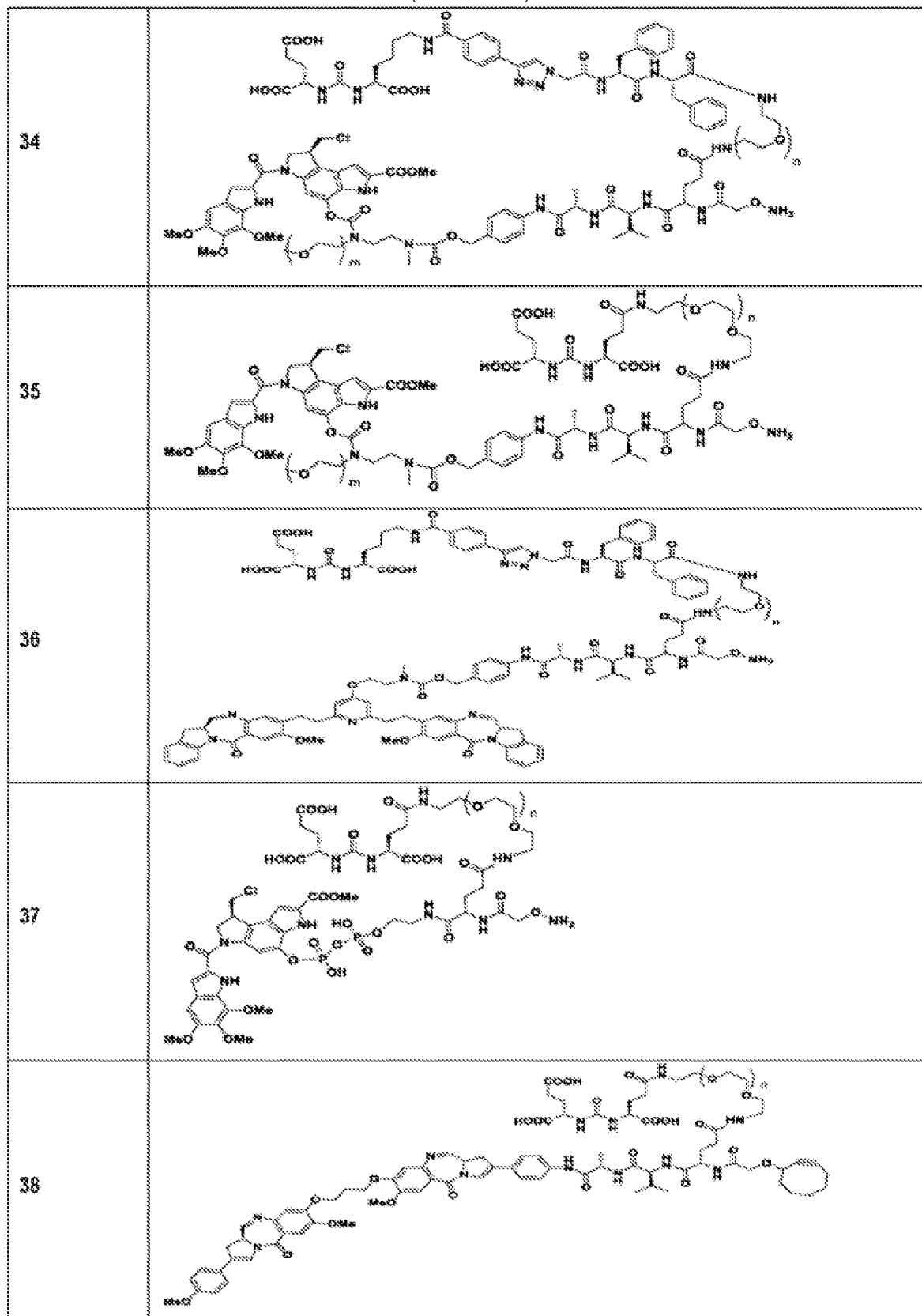
(continuación)



(continuación)



(continuación)



5 [0126] En algunos aspectos de la divulgación se desea un anticuerpo anti-PSMA, variante o conjugado de fármaco con aumento de la semivida sérica, solubilidad en agua, biodisponibilidad, semivida terapéutica, o tiempo de circulación, o para modular la inmunogenicidad, o actividad biológica. Un método para conseguir las características deseadas de la composición anti-PSMA descrita en el presente documento es mediante la unión covalente del polímero polietilenglicol (PEG). Para maximizar las propiedades deseadas del polietilenglicol, el peso molecular total y el estado de hidratación del polímero o polímeros unidos a la molécula biológicamente activa deben ser lo suficientemente elevados como para conferir las características ventajosas típicamente asociadas a dicha unión polimérica, como el aumento de la solubilidad en agua y la semivida circulante, sin afectar negativamente a la bioactividad de la molécula a la que está unido el polietilenglicol.

15 [0127] Los derivados de polietilenglicol están frecuentemente unidos a moléculas biológicamente activas a través de funcionalidades químicas reactivas, como residuos de aminoácidos, el N-terminal, y/o moléculas de carbohidratos. El documento WO99/67291 divulga un proceso para conjugar una proteína con polietilenglicol, en el que al menos un residuo de aminoácido de la proteína se sustituye con un aminoácido sintético y la proteína se pone en contacto con polietilenglicol en condiciones suficientes para lograr la conjugación con la proteína.

20 [0128] Las proteínas y otras moléculas suelen tener un número limitado de sitios reactivos disponibles para la fijación de polímeros. Los sitios más adecuados para la modificación mediante la unión a polímeros pueden desempeñar un papel importante en la unión a receptores, y dichos sitios pueden ser necesarios para la retención de la actividad biológica de la molécula, por lo que resultan inapropiados para la unión a polímeros. Como resultado, la unión indiscriminada de cadenas poliméricas a tales sitios reactivos en una molécula biológicamente activa a menudo conduce a una reducción significativa o incluso a la pérdida total de la actividad biológica de la molécula modificada con polímeros, la unión de polietilenglicol puede dirigirse a una posición particular dentro de una proteína de tal manera que la fracción de polietilenglicol no interfiera con la función de esa proteína. Un método para dirigir la fijación del polietilenglicol consiste en introducir un aminoácido sintético en la secuencia proteica. La maquinaria biosintética de proteínas del procarionta *Escherichia coli* (*E. coli*) puede alterarse para incorporar aminoácidos sintéticos de forma eficiente y con alta fidelidad a las proteínas en respuesta al codón ámbar, UAG. Véase, por ejemplo, J. W. Chin et al., J. Amer. Chem. Soc. 124: 9026-9027, 2002; J. W. Chin, & P. G. Schultz, ChemBioChem 3(11): 1135-1137, 2002; J. W. Chin, et al., PNAS USA 99: 11020-11024, 2002; y, L. Wang, & P. G. Schultz, Chem. Com., 1: 1-11, 2002. Un método similar se puede llevar a cabo con el eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin et al., Science 301: 964-7, 2003). Utilizando este método, se puede incorporar un aminoácido codificado no naturalmente al anticuerpo anti-PSMA, variante o conjugado de fármaco de la presente divulgación, proporcionando un sitio de unión para el polietilenglicol. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2010/011735 y WO2005/074650.

#### 35 Composiciones Farmacéuticas

40 [0129] En otros aspectos de la presente divulgación, las variantes de anticuerpo PSMA o los conjugados de fármaco de anticuerpo PSMA comprenden además una composición o formulación farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede emplear diversos excipientes farmacéuticamente aceptables, estabilizantes, tampones, y otros componentes para su administración a animales. Véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19.<sup>a</sup> ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Identificar la composición o las formulaciones adecuadas para la estabilidad, la administración a un sujeto y la actividad varía con cada compuesto, ya que es necesario tener en cuenta una serie de componentes (por ejemplo, componentes purificadores y estabilizadores). Las sales adecuadas para su inclusión en la composición o formulación pueden incluir, entre otras, cloruro sódico, cloruro potásico o cloruro cálcico. Pueden utilizarse agentes tamponadores y/o estabilizadores como el acetato de sodio. Los tampones adecuados pueden incluir tampón fosfato-citrato, tampón fosfato, tampón citrato, L-histidina, clorhidrato de L-arginina, tampón bicarbonato, tampón succinato, tampón citrato, y tampón TRIS, solos o combinados. También pueden emplearse tensioactivos, incluidos polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80), sulfato de dodecilo (SDS), lecitina, solos o combinados.

50 [0130] En algunos aspectos de la presente divulgación, la composición o formulación farmacéutica puede ser una composición acuosa o en forma de composición líquida reconstituida o en polvo. La composición o formulación puede tener un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0 o entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5 cuando la formulación está en forma líquida. Sin embargo, el médico experto puede ajustar el pH para proporcionar una estabilidad y administración aceptables.

60 [0131] La composición puede almacenarse en un vial o cartucho, un dispositivo de administración en pluma, una jeringa, un tubo de administración intravenosa o una bolsa de administración intravenosa, pero no se limita a ellos. En otros aspectos, una composición farmacéutica de la divulgación puede administrarse como dosis única o seguida de una o más dosis posteriores minutos, días, o semanas después de la primera dosis. Pueden contemplarse otras administraciones según sea necesario para tratar, reducir o prevenir un cáncer, incluido el de próstata.

65 [0132] En algunos casos, los anticuerpos PSMA, las variantes o las composiciones de ADC anti-PSMA de la presente divulgación pueden usarse junto con una terapia o tratamiento adicional que incluye, entre otros, cirugía, radiación, criocirugía, termoterapia, tratamiento hormonal, quimioterapia, vacunas y otras inmunoterapias. En algunos aspectos, dicho tratamiento adicional puede incluir un agente terapéutico como un agente quimioterapéutico, un agente hormonal,

un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos. En un aspecto, el agente hormonal es enzalutamida.

**[0133]** En otros aspectos, los ADC anti-PSMA de la divulgación pueden administrarse con uno o más agentes inmunoestimulantes para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria. Agentes inmunoestimulantes que pueden estimular brazos específicos del sistema inmunitario, como las células natural killer (NK) que median en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Dichos agentes inmunoestimulantes incluyen, entre otros, IL-2, oligonucleótidos inmunoestimulantes (por ejemplo, motivos CpG),  $\alpha$ -interferón,  $\gamma$ -interferón, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). En otros aspectos, los ADC anti-PSMA de la divulgación pueden administrarse con uno o más inmunomoduladores incluyendo, pero sin limitarse a, citoquinas, quimioquinas (incluyendo, pero sin limitarse a, SLC5 ELC, MIP3 $\alpha$ , MIP3 $\beta$ , IP-IO, MIG, y combinaciones de los mismos). Otros agentes terapéuticos pueden ser una vacuna que inmuniza a un sujeto contra el PSMA. Dichas vacunas, en algunos aspectos, incluyen antígenos, como dímeros de PSMA, con, opcionalmente, uno o más adyuvantes para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes de muchos tipos son bien conocidos en la técnica.

**[0134]** El agente quimioterapéutico o cualquier agente implicado en el tratamiento, reducción o prevención de una enfermedad, afección o cáncer en un sujeto que lo necesite también puede administrarse en combinación con un ADC anti-PSMA de la divulgación. Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir, entre otros, erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE<sup>®</sup>, Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX<sup>®</sup>, AstraZeneca), sunitinib (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA<sup>®</sup>, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC<sup>®</sup>, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin<sup>®</sup>, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE<sup>®</sup>, Wyeth), lapatinib (TYKERB<sup>®</sup>, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.), y gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN<sup>®</sup>; alquilo sulfonatos como busulfán, improsulfán y piposulfán; antineoplásicos antifolatos como pemetrexed (ALIMTA<sup>®</sup>, Eli Lilly), aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; las etileniminas y las metilamelaminas, incluidas la altretamina, la trietilenemelamina, la trietilenfosforamida, la trietilfosforamida y la trimetilomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona) camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clorafanfazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosoureas, como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos, como los antibióticos enedina, calicheamicina, calicheamicina gamma11 y calicheamicina omegal1; dinemicina, incluida la dinemicina A; bifosfonatos, como el clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos enediyne relacionados, aclacinomisininas, actinomicina, antramincina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabina, caminomycinina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN<sup>®</sup> doxorubicina (incluida morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como la mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycinina, potfiromycinina, puromycinina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; análogos de las purinas como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de las pirimidinas como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiandrógenos (por ejemplo, enzalutamida) o terapia de privación de andrógenos; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico como el ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maytansinoides como la maytansina y las ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK<sup>®</sup> (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE<sup>™</sup> Cremophor-free, albúmina, formulación de nanopartículas de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE<sup>®</sup> doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; GEMZAR<sup>®</sup> gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE<sup>®</sup> vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como el ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

**[0135]** El término "aproximadamente" será comprendido por las personas con conocimientos ordinarios en la técnica y variará en cierta medida en función del contexto en el que se utilice.

**Ejemplos**

**[0136] Ejemplo 1:** Transfección Transitoria. Los cultivos CHO-S se sembraron a  $0,75 \times 10^6$ /mL aproximadamente 16 horas antes de la transfección en medio FreeStyle CHO. Las células se transfectaron al día siguiente, cuando el recuento celular alcanzó  $1,4 - 1,6 \times 10^6$ /mL. Una vez alcanzado el recuento celular objetivo, se añadió 400 mM de para-acetilo fenilalanina (pAF) a una concentración final de cultivo de 1,4 mM.

**[0137]** El complejo polietilenimina/ADN (PEI/ADN) se preparó como se ha descrito: Se disolvió ADN ( $1,42 \text{ ug}/1 \times 10^6$  células) en medio RPMI (5% (v/v) del volumen total del cultivo), se incubó la mezcla de ADN/RPMI a temperatura ambiente durante 2 minutos, se añadió PEI stock (1 mg/mL) a la solución de ADN en una proporción 3:1 (PEI/ADN (ug/ug)), y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min.

**[0138]** La mezcla se añadió suavemente al cultivo celular y se agitó. Los matraces se transfirieron a una incubadora a 32 °C. A los 6 días post-transfección, se realizó un análisis western blot. A los 7 días post-transfección, se recogió el sobrenadante.

**[0139] Ejemplo 2:** Humanización del anticuerpo - El anticuerpo parental de ratón J591 (Liu et al., Cancer Research, 57, 3629-36354, 1997) se humanizó seleccionando estructuras humanas basadas en la identidad de secuencia con la secuencia de la estructura de ratón. Las CDR de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo de ratón se injertaron en las estructuras humanas, respectivamente, y se analizó su unión al antígeno PSMA. Las variantes humanizadas se generaron emparejando cuatro estructuras humanas de cadena pesada con seis estructuras de cadena ligera. Las variantes se expresaron transitoriamente en células HEK293 y se analizó la unión de los sobrenadantes al antígeno PSMA expresado en células LnCap mediante FACS. La Tabla 4 describe una secuencia seleccionada de región variable de cadena pesada y 4 secuencias de región variable de cadena ligera utilizadas para estudios posteriores. El análisis de unión mostró que cuatro variantes humanizadas de longitud completa, mostradas como variantes humanizadas anti-PSMA 1, 2, 3 y 4 (Tabla 4), conservaban una afinidad de unión comparable a la quimera, (Tabla 4), mostrando una afinidad de unión de rango nanomolar. Como se indica en la Tabla 4, la variante humanizada anti-PSMA 1 comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ. ID N.º: 8 y la secuencia de cadena ligera de SEQ. ID N.º: 9; la variante humanizada anti-PSMA 2 comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ. ID N.º: 10 y la secuencia de cadena ligera de SEQ. ID N.º: 11; la variante humanizada anti-PSMA 3 comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ. ID N.º: 12 y la secuencia de cadena ligera de SEQ. ID N.º: 13; y la variante humanizada anti-PSMA 4 comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ. ID N.º: 14 y la secuencia de cadena ligera de SEQ. ID N.º: 15.

**Tabla 4.** Secuencias de Aminoácidos Variantes del Anticuerpo anti-PSMA

<b>Secuencias de anticuerpos anti-PSMA humanizados y quiméricos</b>	
<b>Secuencia de Región Variable de Cadena Pesada Humanizada</b>	
SEQ ID NO: 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLLEWMGNINPNNGGTTYNQKFDPRVTITRDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTVSS
<b>Secuencia de Región Variable de Cadena Ligera Humanizada</b>	
SEQ ID NO: 2	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ ID NO: 3	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQ PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ ID NO: 4	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ SEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ ID NO: 5	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQ

(continuación)

	PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIKRTV
5	<b>Secuencia de Región Variable de Cadena Pesada Quimérica</b> SEQ ID NO: 6
10	EVQLQQSGPELVKPGTQSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLWIGNINPNINGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLVSS
15	<b>Secuencia de Región Variable de Cadena Ligera Quimérica</b> SEQ ID NO: 7
	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITNV QSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTKVEIKRTV
	<b>Variante Anti-PSMA 1 humanizada (longitud completa)</b> SEQ ID NO: 8
20	<b>Cadena Pesada</b> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIMGNINPNINGGTTYNQKFEDRVITITRDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLVSS <sub>Asik</sub> gsvfplapsekstsggtaalgclvkdypspvtvswngaltsgvhtfpa vlqssgylsissvvtvpsessigtqyicrvnhkpenkvdkkvepkscdklhtcpccpapeliggpsvflfppkpkdlmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqnystyrvsvlvlhqdwingkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltpprdeltknqvltoivkgfypsdiaveweengqpenny kttppvldsdgcflyskitvdksrwqggrvfvscvmhealhrhnytqkslsespg
25	
30	SEQ ID NO: 9 <b>Cadena Ligera</b>
	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIKRTV <sub>aa</sub> psvflfppsdgqlksgtasvdlinnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstysls stltskadyekhkvyacevthqglsspvtkcfnrgec
35	
	<b>Variante Anti-PSMA 2 humanizada (longitud completa)</b> SEQ ID NO: 10
40	<b>Cadena Pesada</b> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIMGNINPNINGGTTYNQKFEDRVITITRDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLVSS <sub>Asik</sub> gsvfplapsskstsggtaalgclvkdypspvtvswngaltsgvhtfpa vlqssgylsissvvtvpsessigtqyicrvnhkpenkvdkkvepkscdklhtcpccpapeliggpsvflfppkpkdlmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqnystyrvsvlvlhqdwingkeykckvenkalpapiektiskakgqprepqvyltpprdeltknqvltoivkgfypsdiaveweengqpenny kttppvldsdgcflyskitvdksrwqggrvfvscvmhealhrhnytqkslsespg
45	
50	SEQ ID NO: 11 <b>Cadena Ligera</b>
	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIKRTV <sub>aa</sub> psvflfppsdgqlksgtasvdlinnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstysls stltskadyekhkvyacevthqglsspvtkcfnrgec
55	
	<b>Variante Anti-PSMA 3 humanizada (longitud completa)</b> SEQ ID NO: 12
60	<b>Cadena Pesada</b> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIMGNINPNINGGTTYNQKFEDRVITITRDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLVSS <sub>Asik</sub> gsvfplapsekstsggtaalgclvkdypspvtvswngaltsgvhtfpa vlqssgylsissvvtvpsessigtqyicrvnhkpenkvdkkvepkscdklhtcpccpapeliggpsvflfppkpkdlmistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv

65

(continuación)

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

<p>evhnaktkpreeqynstynvsvltvlhqdwingkykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltpperdeltknqvsitcivkgfypsdiaveweengqpenny kltppvldsdgofflyekiltvdkerwqqgrvfscsvmhailhshytqkalsispq</p> <p>SEQ ID NO: 13 <b>Cadena Ligera</b></p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEIKRTVaapsvflfppedeqlksgtasvcllnfybreakvqwkvdnalsqnsqesvteqdskdstysls stliliskadyekhkvyacsvthggicsspvtksfhrgec</p>
<p><b>Variante Anti-PSMA 4 humanizada (longitud completa)</b></p> <p>SEQ ID NO: 14 <b>Cadena Pesada</b></p> <p>QVQLVQSGAEVVKKFGASVKVSCKASGYTFEYTIHWVRQAPGQRLEWMMONINPNNGGTTYNQKFEDRVTITRDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGGTTLVSSAsikgpsvflapeskatsggtaalgolvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpa vlqssglyslssvvtvpssslgtqlyicrvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapeilggpsevflfppkpkdlimiarlpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgv evhnaktkpreeqynstynvsvltvlhqdwingkykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltpperdeltknqvsitcivkgfypsdiaveweengqpenny kltppvldsdgofflyekiltvdkerwqqgrvfscsvmhailhshytqkalsispq</p> <p>SEQ ID NO: 15 <b>Cadena Ligera</b></p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEIKRTVaapsvflfppedeqlksgtasvcllnfybreakvqwkvdnalsqnsqesvteqdskdstysls stliliskadyekhkvyacsvthggicsspvtksfhrgec</p>
<p><b>Variante de Anticuerpo Anti-PSMA Quimérica (longitud completa)</b></p> <p>SEQ ID NO: 16 <b>Cadena Pesada</b></p> <p>EVQLQQSQPELVKPGTSVRISCKTSGYTFEYTIHWVKQSHGKSLIEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGGGTTLVSSAsikgpsvflapeskatsggtaalgolvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpa qesglyslssvvtvpssslgtqlyicrvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtppcpapeilggpsevflfppkpkdlimiarlpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgve vhnaktkpreeqynstynvsvltvlhqdwingkykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyltpperdeltknqvsitcivkgfypsdiaveweengqpennyk ltpvldsdgofflyekiltvdkerwqqgrvfscsvmhailhshytqkalsispq</p> <p>SEQ ID NO: 17 <b>Cadena Ligera</b></p> <p>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNV QSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTKVEIKRTVaapevflfppedeqlksgtasvcllnfybreakvqwkvdnalsqnsqesvteqdskdstysls stliliskadyekhk</p>

[0140] **Ejemplo 3:** Expresión recombinante de anticuerpos anti-PSMA - Se seleccionaron anticuerpos anti-PSMA humanizados y se expresaron recombinantemente en células CHO tanto por transfección transitoria (descrita en el Ejemplo 1) como por el método de pool estable para examinar la expresión de la secuencia humanizada. En los enfoques de transfección transitoria y de reserva estable a granel se incorporó tecnología patentada en el vector de expresión y en las células huésped CHO, respectivamente (véase, por ejemplo, el documento WO2018/223108). El aminoácido no natural para acetilo fenilalanina (pAF) se incorporó en la posición A114, (esquema de numeración de Kabat, (véase Kabat et al., NIH Publication No. 369-847, 1993); posición indicada en la Tabla 4 por A), en el anticuerpo PSMA, que es el primer residuo de aminoácido de la región constante de la cadena pesada.

[0141] **Ejemplo 4:** Producción de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) - Los anticuerpos pueden purificarse utilizando métodos basados en la cromatografía, bien conocidos por los expertos en la materia, que implican la captura por afinidad de proteína A y el pulido por intercambio catiónico. El anticuerpo recogido en el medio de cultivo celular se captura en una columna de afinidad de proteína A y se eluye en condiciones ácidas. La preparación de anticuerpos se valora a pH 5 y se pule pasándola por una columna de intercambio catiónico. Utilizando el intercambio post catiónico, el anticuerpo puede ser intercambiado en el tampón de conjugación.

[0142] En la presente invención, el anticuerpo humanizado anti-PSMA se conjugó con una toxina, (MMAE o MMAF), a través de un pequeño enlazador hidrofílico. El enlazador fármaco-carga útil se conjuga covalentemente con el PAF en la cadena pesada anti-PSMA, dando lugar a la formación de anti-PSMA-ADC(s). El anticuerpo PSMA se conjuga con el enlazador fármaco-carga mediante incubación a 28°C en presencia de 135 mM de hidrazida acética, que actúa como catalizador. Se eliminaron los anticuerpos no conjugados, la carga útil del fármaco no conjugada, los agregados y las impurezas haciendo pasar la mezcla de reacción por una columna de cromatografía de intercambio catiónico antes de intercambiar el ADC anti-PSMA en el tampón de formulación (50 mM de histidina, 150 mM de cloruro sódico, 2,5% de trehalosa pH 6). El conjugado anticuerpo-fármaco se eluyó de la columna bajo un gradiente salino generando un pico monodisperso.

[0143] La caracterización analítica del pico monodisperso de la cromatografía de intercambio catiónico muestra que la especie principal es el ADC anti-PSMA con una relación fármaco-anticuerpo (DAR) que oscila entre 1,8 y 2, se observó en 8 horas. Las evaluaciones de control de calidad realizadas en anticuerpos y ADC de la invención muestran que todas las preparaciones generadas por esta estrategia resultaron en materiales de calidad superior que contenían < 3% de agregados y < 5 EU/mg de nivel de endotoxina.

[0144] Se generaron quince (15) ADC anti-PSMA con dos variantes principales humanizadas y anticuerpos quiméricos utilizando los 5 enlaces de carga útil - MMAE no escindible, MMAF no escindible, MMAF escindible, MMAF escindible corto, y MMAE escindible corto, divulgados aquí. Los ADC anti-PSMA generados con las variantes humanizadas 1 y 2, divulgadas en la Tabla 4, se seleccionaron para estudios posteriores en los siguientes Ejemplos.

[0145] **Ejemplo 5:** Estudios de potencia in vitro - La potencia in vitro de los ADC anti-PSMA se determina utilizando una línea celular representativa de cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC), C4-2. El cultivo celular se incubó con los conjugados anticuerpo-fármaco durante 96 horas a 37°C. La viabilidad celular se analiza utilizando Cell Titer Glo® (Promega, EE.UU.). La actividad antiproliferativa está representada por la potencia, IC<sub>50</sub>, la concentración a la que se alcanza el 50% de la actividad máxima y la muerte celular, y E<sub>max</sub>, el nivel máximo de inhibición del crecimiento. La Tabla 5 resume la destrucción celular y la potencia in vitro de los ADC anti-PSMA.

**Tabla 5.** Actividad de destrucción celular in vitro en líneas celulares C4-2

Carga Útil	Ligador	Variante 1 de Anticuerpo Anti-PSMA humanizado		Variante 2 de Anticuerpo Anti-PSMA humanizado		Anticuerpo Anti-PSMA Quimérico	
		IC <sub>50</sub> (nM)	Exterminio celular (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	Exterminio celular (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	Exterminio celular (%)
MMAE	No Escindible (PEG <sub>3</sub> )	11.3	64.5	12.5	67	10.2	62.5
MMAF	No Escindible (PEG <sub>3</sub> )	0.543	80.5	0.503	81	0.295	89.5
MMAF	Escindible (Val-Citrulina-PEG <sub>1</sub> )	0.066	91	0.051	91	0.047	89.5
MMAF	Escindible corto (Valina-Citrulina-Acetil)	0.064	92	0.053	91	0.049	94.5
MMAE	Escindible corto (Valina-Citrulina-Acetil)	0.542	81.5	0.52	81.5	0.425	82.5

[0146] El ensayo de actividad de destrucción celular sugiere que la combinación carga útil-enlazador es crítica para el desarrollo de conjugados anticuerpo-fármaco potentes. Los potentes conjugados anticuerpo-fármaco mostraron una potencia subnanomolar con >75% de destrucción celular. Los conjugados anticuerpo-fármaco con cargas útiles MMAF revelaron una mayor potencia y capacidad de destrucción celular que los conjugados anticuerpo-fármaco con cargas útiles

MMAE. El estudio de destrucción celular in vitro sugiere que los ADC anti-PSMA con carga útil MMAF mostraron una potencia un orden de magnitud mayor que los ADC anti-PSMA con carga útil MMAE.

**[0147]** Este estudio también demuestra que la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco también se ve influenciada por el tipo de enlazador. Los conjugados anticuerpo-fármaco con enlazadores escindibles mostraron una mayor potencia y capacidad de destrucción celular en comparación con los conjugados anticuerpo-fármaco con enlazador no escindible para el mismo tipo de carga útil. Como se muestra en la Tabla 5, el estudio de destrucción celular in vitro muestra que los ADC anti-PSMA con carga útil MMAE o MMAF exhibieron una potencia de un orden de magnitud mayor para los enlazadores escindibles que para los no escindibles. Esto sugiere que se pueden generar potentes ADC anti-PSMA mediante la combinación adecuada de cargas útiles citotóxicas con enlazadores. La combinación de la carga útil MMAE con un enlazador no escindible reveló una potencia y una mortalidad pobres. Además, la destrucción de las células diana por los ADC de anticuerpos anti-PSMA se consigue mediante la administración dirigida de agentes citotóxicos por el anticuerpo anti-PSMA. La administración dirigida de agentes citotóxicos se ve facilitada por la unión del componente anticuerpo anti-PSMA del conjugado anticuerpo-fármaco al receptor o antígeno, PSMA, expresado en la superficie celular, que es internalizado en la célula por el receptor. Los estudios con líneas celulares de cáncer de próstata que no expresan PSMA, como la PC-3, sugieren que los ADC anti-PSMA potentes no ejercen ninguna actividad de destrucción celular. Las líneas celulares PC-3 incubadas con potentes ADC anti-PSMA durante 96 horas no murieron. Esto sugiere que los ADC anti-PSMA inventados son específicos de la diana. No se observó ningún efecto letal secundario de los conjugados anticuerpo-fármaco. La ausencia de efecto letal secundario de los conjugados anticuerpo-fármaco inventados es fundamental para eliminar las toxicidades no específicas fuera de diana debidas al componente de toxina, que a menudo se observan en los conjugados anticuerpo-fármaco que contienen carga útil MMAE como carga útil citotóxica. Además, la actividad específica de los ADC anti-PSMA inventados hace que estos ADC sean valiosos para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico. La observación de estos estudios sugiere que cualquier lesión cancerosa más allá del tejido prostático canceroso primario que exprese PSMA puede tratarse con los ADC anti-PSMA inventados.

**[0148]** Además, la actividad de destrucción celular de los ADC anti-PSMA depende del número de receptores expresados en la superficie celular. Las líneas celulares de cáncer de próstata con números de copias del receptor >60000 pueden ser eliminadas eficientemente por los ADC anti-PSMA de la invención. Por ejemplo, el estudio de destrucción celular in vitro realizado con ADC anti-PSMA que contienen carga útil MMAF con enlazador no escindible mostró la destrucción de líneas celulares con número de copias del receptor >60000, Tabla 6, mediante análisis inmunohistoquímico (IHC) e inmunofluorescencia indirecta cuantitativa (QiFi).

**Tabla 6.** Expresión de PSMA y actividad citotóxica in vitro de anti-PSMA-ADC en líneas celulares de cáncer de próstata humano

Líneas de células PCa	Tipo de tumor	Número de superficie celular PSMA (QiFi)	IC <sub>50</sub> (nM)	E <sub>max</sub> (%)	Puntuación PSMA IHC
C4-2	Próstata	84378 (± 24440)	1.498	86	3 <sup>‡</sup>
MDA-PCa-2B	Próstata	67771 (± 7636)	0.436	62	3 <sup>††</sup>
VCap	Próstata	13470 (± 4278)	Sin actividad		1 <sup>††</sup>
22Rv1	Próstata	8572 (± 2123)	Sin actividad		1 <sup>‡</sup>
PC-3	Próstata	890 (± 727)	Sin actividad		Negativa

<sup>‡</sup> - Determinado de los bloques de xenoinjerto de tumor in vivo; <sup>†</sup> - No determinado debido a crecimiento deficiente

<sup>††</sup> - Determinado de los gránulos celulares

**[0149]** La dependencia de la actividad de destrucción celular de los ADC anti-PSMA inventados del número de copias del receptor de PSMA es indicativa del beneficio terapéutico para tratar el cáncer de próstata. El número de copias del receptor PSMA suele ser elevado en el tejido prostático canceroso en comparación con la expresión de PSMA en tejidos sin cáncer. Esta expresión diferencial en el número de copias del receptor PSMA entre el tejido prostático canceroso y los tejidos normales puede facilitar la reducción y/o eliminación de la toxicidad no relacionada con el tejido prostático. Este análisis sugiere que los ADC anti-PSMA pueden mostrar una baja actividad en tejidos que expresan un bajo número de copias del receptor PSMA que en tejido prostático canceroso con un alto número de copias del receptor PSMA. Por lo tanto, la toxicidad de fondo del conjugado anticuerpo-fármaco puede reducirse significativamente.

**[0150] Ejemplo 6:** Perfil farmacocinético (PK) con carga útil de fármaco - La estabilidad sistémica de los ADC anti-PSMA aquí descritos puede evaluarse realizando estudios farmacocinéticos en ratones y ratas en los que los conjugados anticuerpo-fármaco se administran en bolo intravenoso (i.v). La evaluación farmacocinética sugiere que la estabilidad del

conjugado anticuerpo-fármaco intacto depende de la estabilidad del enlazador. Los estudios realizados en ratones con una dosis única de 1 mg/kg sugieren que los ADC anti-PSMA con carga útil MMAF unida por un enlazador no escindible o escindible corto (Val-Citrulina-Acetilo) permanecen intactos durante toda la duración del estudio. La semivida de los ADC anti-PSMA intactos con carga útil MMAF unida por un no escindible o escindible corto es de 10 días, Figura 1, (2 paneles superiores). La estabilidad sistémica del enlazador corto escindible es independiente de la carga útil. El enlazador en el ADC anti-PSMA con carga útil MMAE unida por un enlazador corto escindible también permanece intacto a lo largo de la duración del estudio con una semivida del conjugado anticuerpo-fármaco intacto de hasta 10 días, Figura 1, (panel inferior derecho). Sin embargo, en contraste, el enlazador en el ADC anti-PSMA con carga útil MMAF enlazada por un enlazador escindible (Val-Citruline-PEG<sub>1</sub>) se escinde pronto, reduciendo la vida media del conjugado anticuerpo-fármaco intacto a aproximadamente 4 días, Figura 1, (panel inferior izquierdo). F1 representa la detección del conjugado anticuerpo-fármaco en el suero por el anticuerpo. F3 representa la detección del conjugado anticuerpo-fármaco en el suero por el enlazador toxina-carga útil.

**[0151]** La estabilidad sistémica del ADC anti-PSMA con MMAF no eliminable también se evaluó en ratas a dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg. El estudio reveló que el conjugado anticuerpo-fármaco era estable, y que el enlazador y el agente citotóxico permanecían intactos durante todo el estudio (Figura 2).

**[0152]** Se realizaron estudios en ratas para comparar el perfil farmacocinético de los ADC anti-PSMA con MMAF no escindible y el anticuerpo anti-PSMA, (denotado como anticuerpo desnudo), sin agente citotóxico. La evaluación del perfil farmacocinético sugiere que el aclaramiento del ADC anti-PSMA con MMAF no escindible es similar al anticuerpo anti-PSMA, Figura 3. Esto sugiere que la estabilidad inherente del anticuerpo no se ve afectada por la conjugación específica basada en p-acetil fenilalanina y la carga de fármaco.

**[0153]** La estabilidad del conjugado anticuerpo-fármaco es esencial para reducir la toxicidad debida al agente citotóxico. La prevención de la escisión del agente citotóxico del conjugado anticuerpo-fármaco mientras se encuentra en circulación sistémica es una forma crítica de reducir la toxicidad. Los ADC anti-PSMA divulgados con enlazadores no escindibles y escindibles cortos son significativamente estables en circulación sistémica con el agente citotóxico permaneciendo unido al anticuerpo. Esto es importante, ya que la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco son inestables y la carga útil del fármaco se desprende del enlazador y/o del lugar de conjugación, lo que provoca una toxicidad significativa no relacionada con el objetivo debido al agente citotóxico. La aplicación terapéutica del conjugado anticuerpo-fármaco está actualmente restringida debido a dicha toxicidad. La mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco en ensayos clínicos revelaron toxicidades limitantes de la dosis que podían atribuirse al agente citotóxico. Debido a estas toxicidades, la aplicación terapéutica de los conjugados anticuerpo-fármaco ha sido limitada y, hasta la fecha, sólo se han aprobado cuatro conjugados anticuerpo-fármaco para aplicaciones terapéuticas. Hasta la fecha, el tratamiento del cáncer de próstata con conjugados de anticuerpos dirigidos contra PSMA ha resultado ser un reto debido a las graves toxicidades y a la falta de índice terapéutico. Los datos farmacocinéticos sugieren que los ADC anti-PSMA inventados pueden superar las limitaciones de la toxicidad no específica debida al agente citotóxico previniendo la escisión de la carga útil del fármaco del enlazador y/o sitio de conjugación mediante la combinación única de química de conjugación estable con enlazador estable. La química de conjugación estable utilizada para generar los nuevos ADC anti-PSMA de la invención puede lograrse mediante la formación de un enlace cetoxima entre un aminoácido no natural/no naturalmente, por ejemplo p-acetilo fenilalanina, incorporado en el anticuerpo en lugares específicos y el enlazador fármaco-carga derivado con un grupo hidroxilamina.

**[0154] Ejemplo 7:** Estudios de eficacia in vivo - La eficacia antitumoral de los ADC anti-PSMA, con MMAF no escindible y escindible corto, se probó en el modelo de xenoinjerto tumoral en ratones injertados con línea celular de cáncer de próstata. La línea celular pertinente de cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm), C4-2, se obtuvo de ATCC y se expandió in vitro siguiendo las instrucciones de ATCC. Se cultivaron xenoinjertos de carcinoma humano C4-2 en ratones machos inmunodeficientes con células implantadas por vía subcutánea. Se pesaron los ratones y se midió el volumen tumoral con un calibrador electrónico. El volumen tumoral individual se calculó como longitud×anchura×anchura/2. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por su aspecto) con un volumen medio de 500 mm<sup>3</sup> fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de tratamiento y se les administró una dosis intravenosa por peso corporal individual. Se administraron ADC anti-PSMA a 0,1, 1, 5, y 10 mg/kg.

**[0155]** Los estudios sugieren que los ADC anti-PSMA con MMAF no escindible y escindible corto fueron efectivos en prevenir el crecimiento tumoral. A 5 mg/kg y 10 mg/kg, los ADC anti-PSMA fueron eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral durante 37 días tras la dosificación. A 1 mg/kg, los ADC anti-PSMA fueron eficaces en la estasis tumoral hasta que se observó un nuevo crecimiento tras 35 días después de la dosificación. A la dosis de 0,1 mg/kg, no se observó ninguna diferenciación significativa con respecto a los controles. El análisis del peso corporal muestra que los animales tratados también ganaron peso como los ratones normales y sanos, lo que implica que no hay toxicidad manifiesta asociada a los ADC anti-PSMA. Las Figuras 4A y 4B muestran resultados de volumen tumoral y peso corporal representativos de ADC anti-PSMA de la invención que comprenden MMAF no escindible. Las Figuras 5A y 5B muestran los resultados de volumen tumoral y peso corporal representativos de los ADC anti-PSMA de la invención que comprenden MMAF escindible corto.

**[0156] Ejemplo 8:** Estudios farmacocinéticos con MMAF no escindible - Se evaluó la farmacocinética (PK) en ratones portadores y no portadores de tumores tras una dosis única de ADC anti-PSMA utilizando un MMAF no escindible. Los

ratones fueron inyectados mediante bolo intravenoso con 1 mg/kg o 5 mg/kg del ADC MMAF no escindible. Se recogió suero y se analizó para detectar la presencia del ADC MMAF no escindible. En ambos niveles de dosis evaluados, 1 mg/kg y 5 mg/kg, se observaron perfiles PK similares para las concentraciones de ADC anti-PSMA en ratones portadores y no portadores de tumores (Figura 6A).

**[0157]** También se evaluó la farmacocinética (PK) en mono *Cynomolgus* tras la administración de una dosis única de ADC anti-PSMA utilizando un MMAF no escindible a varias concentraciones de 1,17 mg/kg, 3,86 mg/kg, 9,36 mg/kg, 11,7 mg/kg, 23,3 mg/kg y 35,0 mg/kg (Figura 6B). Los ADC anti-PSMA se administraron en infusión intravenosa, (la vía de administración prevista en la clínica), de 15 a 20 minutos. Tras la dosificación, se recogieron muestras durante 28 días. El bioanálisis para el ADC anti-PSMA intacto se realizó utilizando un método cualificado de Meso Scale Discovery. Se observaron perfiles PK superpuestos para el ADC intacto y el anticuerpo total, lo que confirma que los ADC anti-PSMA de la presente invención son extremadamente estables en la circulación sistémica. Se observó un aumento no lineal de la exposición a dosis más bajas, (1,17 mg/kg a 3,86 mg/kg), que podría atribuirse a la posible eliminación mediada por diana. Un mayor aumento de la dosis dio lugar a un incremento relativamente lineal de las exposiciones con el aumento de la dosis. El aclaramiento fue lento, oscilando entre 0,118 ml/h/kg y 0,304 ml/h/kg, y el volumen de distribución fue pequeño, oscilando entre 44,2 ml/kg y 58,2 ml/kg. La semivida resultante fue larga, oscilando entre 129 y 346 horas, con una tendencia general al aumento de la semivida con el aumento de la dosis. Cabe señalar que la extrema estabilidad del ADC anti-PSMA en la circulación sistémica minimiza la toxicidad fuera del objetivo relacionada con la liberación de carga libre del ADC, promoviendo una larga vida media, lo que permite un régimen de dosificación compatible con el paciente de una vez cada 3 o 4 semanas.

**[0158] Ejemplo 9:** Terapia de combinación de ADC anti-PSMA - Los ADC anti-PSMA de la presente invención pueden usarse en combinación con cualquier agente implicado en el tratamiento, reducción, mejora o prevención del cáncer de próstata en un sujeto que lo necesite, incluyendo pero sin limitarse a terapia hormonal o quimioterapia. Por ejemplo, se ha demostrado que la terapia hormonal enzalutamida, *in vitro*, aumenta aproximadamente 3 veces la expresión de PSMA en la superficie celular (Murga et al.,). Además, los ratones tratados con enzalutamida portadores de tumores de próstata PDX humanos mostraron una mayor inhibición del crecimiento tumoral cuando se combinaron con un ADC de PSMA con la carga útil de auristatina, MMAE (DiPippo et al.,). Basándose en el aumento de la expresión de PSMA observado en la técnica, los inventores estudiaron el efecto *in vivo* de la terapia combinada utilizando los ADC anti-PSMA inventados con la carga útil MMAF y enzalutamida.

**[0159]** La eficacia antitumoral de los ADC anti-PSMA de la invención en combinación con la terapia hormonal enzalutamida se probó en el modelo de xenoinjerto tumoral en ratones injertados con línea celular de cáncer de próstata. La línea celular pertinente de cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm), C4-2, se obtuvo de ATCC y se expandió *in vitro* siguiendo las instrucciones de ATCC. Se cultivaron xenoinjertos de carcinoma humano C4-2 en ratones machos inmunodeficientes con células implantadas por vía subcutánea. También se estudió un segundo modelo en el que se utilizaron ratones machos inmunodeficientes portadores de tumores de próstata de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) TM00298 (Jackson Laboratories, CA).

**[0160]** Se pesaron los ratones y se midió el volumen tumoral con un calibrador electrónico. El volumen tumoral individual se calculó como longitud×anchura×anchura/2. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por su aspecto) con un volumen medio de 500 mm<sup>3</sup> fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de tratamiento y se les administró una dosis intravenosa por peso corporal individual. Los ADC anti-PSMA se administraron por vía intravenosa a razón de 0,5, 1 y 3 mg/kg semanales durante 4 semanas en el modelo C4-2 y a razón de 1 y 3 mg/kg semanales durante 4 semanas en el modelo PDX. En ambos modelos de próstata, se administró enzalutamida por vía oral diariamente a razón de 10 mg/kg, durante 28 días. En ambos modelos de próstata, a un grupo de ratones se le administró una terapia combinada de 1 mg/kg de ADC anti-PSMA más 10 mg/kg de enzalutamida, Figuras 7 y 8. Para el modelo PDX también se administró a los ratones una terapia combinada de 3 mg/kg de ADC anti-PSMA más 10 mg/kg de enzalutamida, Figura 8.

**[0161]** Los ADC anti-PSMA a 3mg/kg y 1mg/kg mostraron que la inhibición tumoral responde a la dosis en un modelo resistente a enzalutamida. La inhibición completa se alcanzó a los 3mg/kg con un 80% de TGI (porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral). Se observó una respuesta parcial a 1mg/kg con un 37% de TGI. El análisis del peso corporal sugiere que los animales tratados también ganaron peso como los ratones normales y sanos, lo que implica que no hay toxicidad manifiesta asociada a los ADC anti-PSMA. Las Figuras 7A y 8A muestran resultados de volumen tumoral y peso corporal (Figuras 7B y 8B) representativos de ADC anti-PSMA de la invención que comprenden MMAF no escindible.

**[0162]** Este estudio demostró una eficacia mejorada con ADC anti-PSMA de la presente invención en combinación con enzalutamida. La enzalutamida, como agente único, aumentó el nivel de PSMA de la superficie celular en las células de cáncer de próstata. La combinación de ADC anti-PSMA con enzalutamida mostró mayor %TGI que la monoterapia. Estos estudios sugieren que los ADC anti-PSMA con MMAF no escindible y escindible corto fueron eficaces en la prevención del crecimiento tumoral con efecto sinérgico en el presente de enzalutamida.

**Ejemplo 10:** Ensayo clínico en humanos sobre la seguridad y/o eficacia del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) anti-PSMA para el tratamiento del cáncer de próstata

**[0163]** Objetivo: Comparar la seguridad y farmacocinética de la composición administrada que comprende ADC anti-

PSMA de la presente invención.

5 **[0164]** Diseño del estudio: Este estudio será un estudio de Fase I, unicéntrico o multicéntrico, abierto y aleatorizado de  
 10 escalada de dosis, seguido de un estudio de Fase II en pacientes con cáncer de próstata. Los pacientes no deben haber  
 estado expuestos al derivado PSMA antes de entrar en el estudio. Los pacientes no deben haber recibido tratamiento  
 para su cáncer en las 2 semanas anteriores al inicio del ensayo. Los tratamientos incluyen el uso de quimioterapia, factores  
 de crecimiento hematopoyético, y terapia biológica como los anticuerpos monoclonales. Los pacientes deben haberse  
 recuperado de todas las toxicidades (hasta grado 0 o 1) asociadas al tratamiento previo. Se evalúa la seguridad de todos  
 los sujetos y todas las extracciones de sangre para el análisis farmacocinético se realizan según lo previsto. Todos los  
 estudios se realizan con la aprobación del comité ético institucional y el consentimiento del paciente.

15 **[0165]** Fase I: Los pacientes reciben ADC anti-PSMA por vía intravenosa en ciclos de dosificación de una vez cada 3  
 20 semanas. Las dosis de ADC anti-PSMA pueden mantenerse o modificarse por toxicidad en función de las evaluaciones  
 que se indican a continuación. El tratamiento se repite cada 3 semanas en ausencia de toxicidad inaceptable. Cohortes  
 de 3-6 pacientes reciben dosis crecientes de ADC anti-PSMA hasta que se determina la dosis máxima tolerada (MTD) de  
 ADC anti-PSMA. La MTD se define como la dosis anterior a aquella en la que 2 de 3 o 2 de 6 pacientes experimentan  
 toxicidad limitante de la dosis. Las toxicidades limitantes de la dosis se determinan de acuerdo con las definiciones y  
 normas establecidas por la versión 3.0 (9 de agosto de 2006) de la Terminología Común para Acontecimientos Adversos  
 (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

25 **[0166]** Fase II: Los pacientes reciben ADC anti-PSMA como en la fase I a la MTD determinada en la fase I. El tratamiento  
 se repite cada 3 semanas durante varios ciclos en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Una  
 vez finalizado el tratamiento del estudio, los pacientes que obtengan una respuesta completa o parcial podrán recibir dosis  
 adicionales. Los pacientes que mantengan la enfermedad estable durante más de 2 meses tras la finalización de 6 ciclos  
 de tratamiento del estudio podrán recibir 6 ciclos adicionales en el momento de la progresión de la enfermedad, siempre  
 que cumplan los criterios de elegibilidad originales.

30 **[0167]** Muestreo de sangre Se extrae sangre en serie por punción venosa directa antes y después de la administración  
 de ADC anti-PSMA. Las muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones séricas se  
 obtienen unos 10 minutos antes de la dosis y aproximadamente a las siguientes horas después de la dosis: 0,5 y 4 horas,  
 días 1, 2, 4, 7, 14, y 21. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se conservan a  
 -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

35 **[0168]** Farmacocinética: Los pacientes se someten a la recogida de muestras de plasma/suero para la evaluación  
 farmacocinética antes de iniciar el tratamiento y tras la administración del fármaco del estudio a las 0,5 y 4 horas, los días  
 1, 2, 4, 7, 14, y 21. Los parámetros farmacocinéticos se calculan mediante métodos independientes del modelo utilizando  
 la última versión del software Phoenix WinNonlin. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos:  
 40 concentración sérica máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ); tiempo hasta la concentración sérica máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ); área bajo la curva concentración-  
 tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo de sangre ( $AUC_{last}$ ) calculada con el uso de la  
 regla trapezoidal lineal; y semivida de eliminación terminal ( $t_{1/2}$ ), calculada a partir de la constante de velocidad de  
 eliminación. La constante de velocidad de eliminación se estima por regresión lineal de puntos de datos consecutivos en  
 la región lineal terminal del gráfico log-lineal concentración-tiempo. Se calculan la media, la desviación estándar (SD), y  
 el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos para cada tratamiento. Se calcula la relación de las  
 medias de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

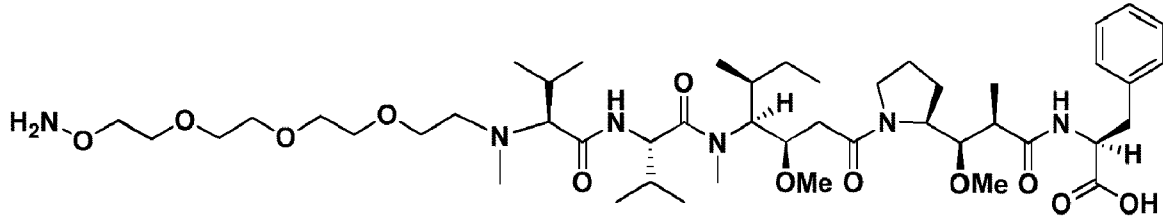
45 **[0169]** Respuesta del paciente a la terapia combinada: La respuesta de los pacientes se evalúa mediante imágenes con  
 rayos X, CT y MRI, y las imágenes se realizan antes de comenzar el estudio y al final del primer ciclo, con imágenes  
 adicionales cada cuatro semanas o al final de los ciclos posteriores. Las modalidades de diagnóstico por imagen se eligen  
 en función del tipo de cáncer y de la viabilidad/disponibilidad, y se utiliza la misma modalidad de diagnóstico por imagen  
 50 para tipos de cáncer similares, así como durante todo el curso del estudio de cada paciente. Las tasas de respuesta se  
 determinan utilizando los criterios RECIST. (Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 92(3):205-16, 2000; en la red mundial en  
<http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). Los pacientes también se someten a una biopsia del  
 cáncer/tumor para evaluar los cambios en el fenotipo de las células progenitoras del cáncer y el crecimiento clonogénico  
 mediante citometría de flujo, Western blotting, y IHC, y para detectar cambios en la citogenética mediante FISH. Una vez  
 55 finalizado el tratamiento del estudio, se realiza un seguimiento periódico de los pacientes durante 4 semanas.

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-antígeno de membrana específico de la próstata (anticuerpo anti-PSMA) conjugado con un enlazador de fármaco, en el que la conjugación se produce a través de una para-acetilo fenilalanina incorporada en la secuencia de cadena pesada, en el que el anticuerpo anti-PSMA comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ ID N.º: 8 y la secuencia de cadena ligera de SEQ ID N.º: 9, en el que se incorpora una para-acetilo fenilalanina en la posición A114 de la cadena pesada según el esquema de numeración de Kabat, y en el que el ligando farmacológico es una monometilo auristatina F no escindible que tiene la estructura:



2. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 y al menos un adyuvante, aglutinante, tampón, portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, comprende además un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

4. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 2 para su uso en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que exprese PSMA, dicho método comprende el contacto del cáncer o célula cancerosa que exprese PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, para su uso en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, dicho método comprende el contacto del cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica.

6. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 2, y un agente terapéutico adicional, para su uso en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que exprese PSMA, dicho método comprende poner en contacto el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, y comprende además poner en contacto el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, en el que el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

7. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 2, para su uso con un agente terapéutico adicional en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA, dicho método comprende contactar el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica, y comprende además poner en contacto el cáncer o célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, en el que el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide, o una combinación de los mismos.

8. Un agente terapéutico adicional, para su uso con el conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 2 en un método de reducción o inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un cáncer o célula cancerosa que exprese PSMA, dicho método comprende poner en contacto el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del agente terapéutico adicional, y comprende además poner en contacto el cáncer o la célula cancerosa que expresa PSMA con una cantidad eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 2, donde el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, un agente hormonal, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos.

9. La composición farmacéutica; conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica y agente terapéutico adicional; conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica; o agente terapéutico adicional; para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en la que el agente terapéutico adicional es un agente hormonal, y en la que el agente hormonal es enzalutamida.

FIGURA 1

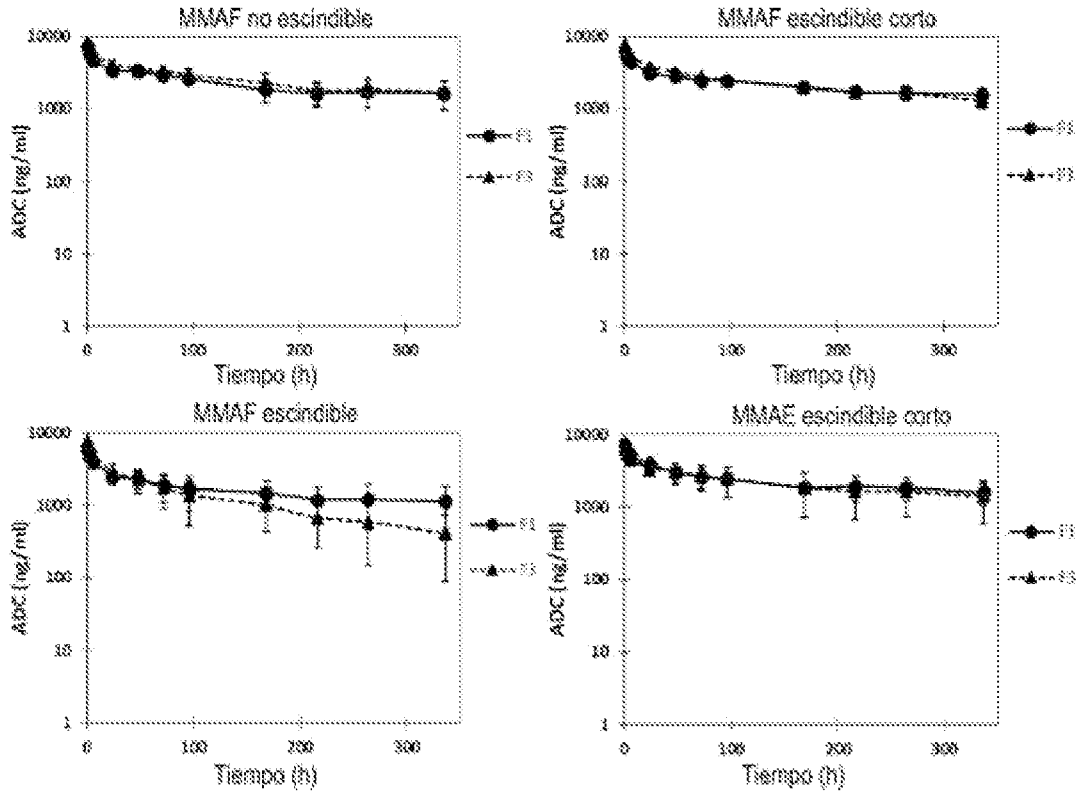


FIGURA 2

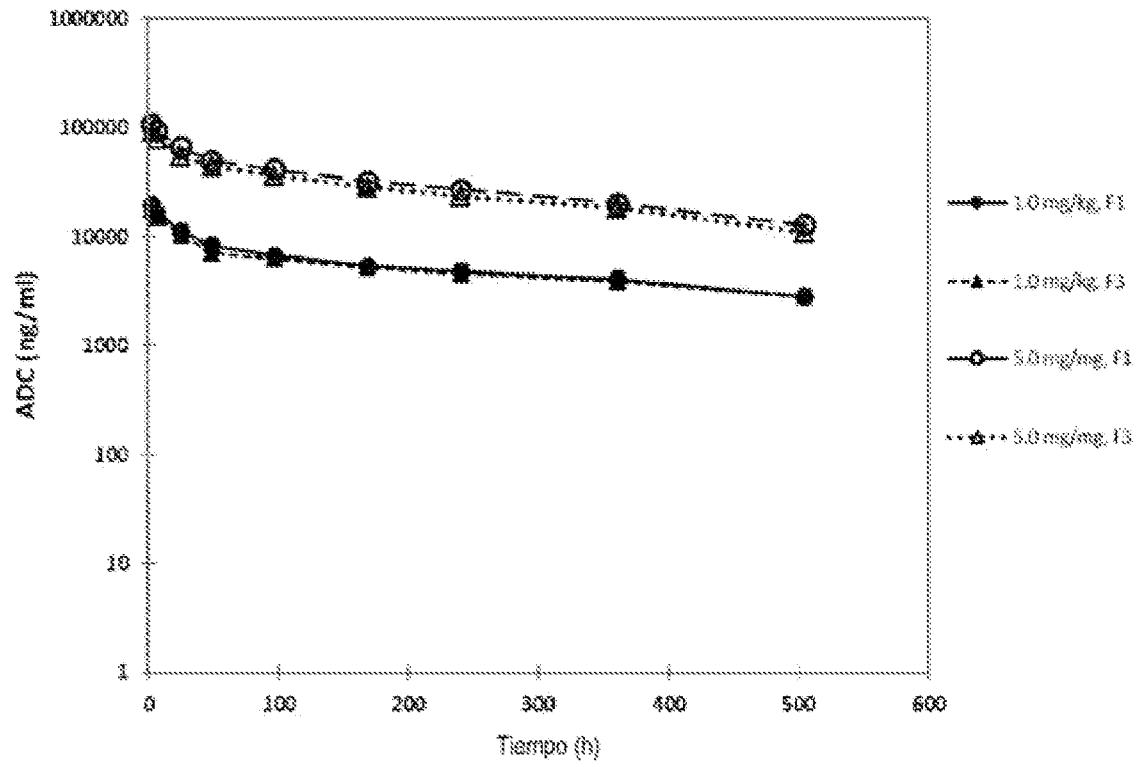


FIGURA 3

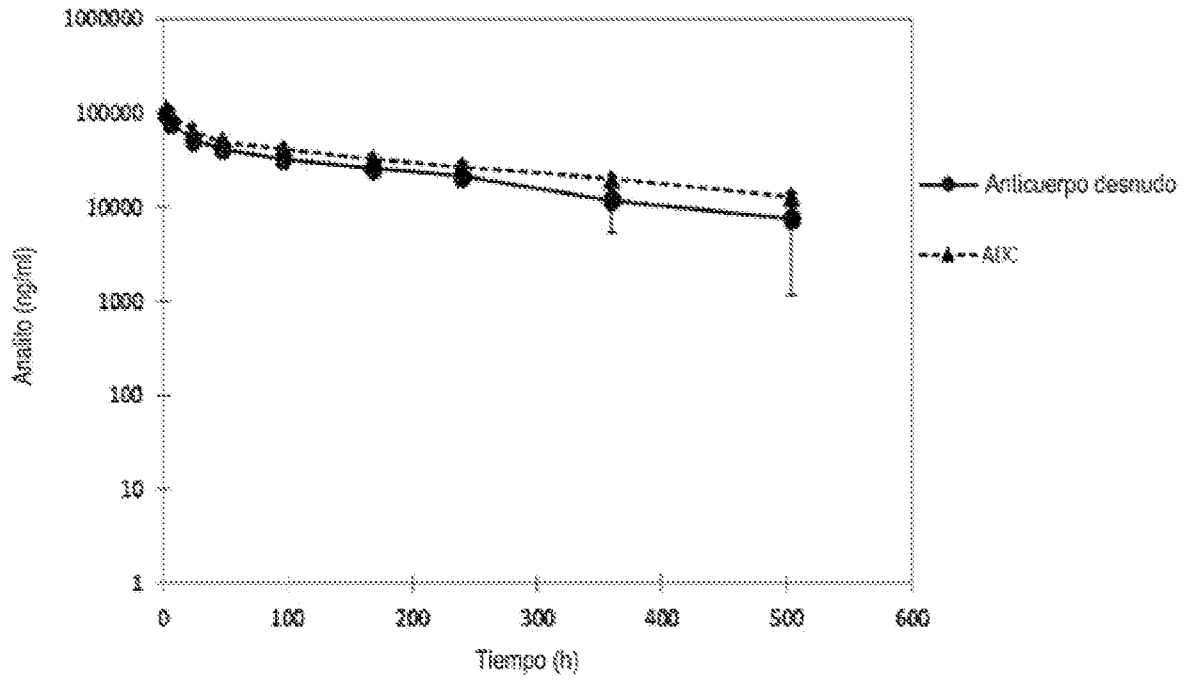


FIGURA 4A

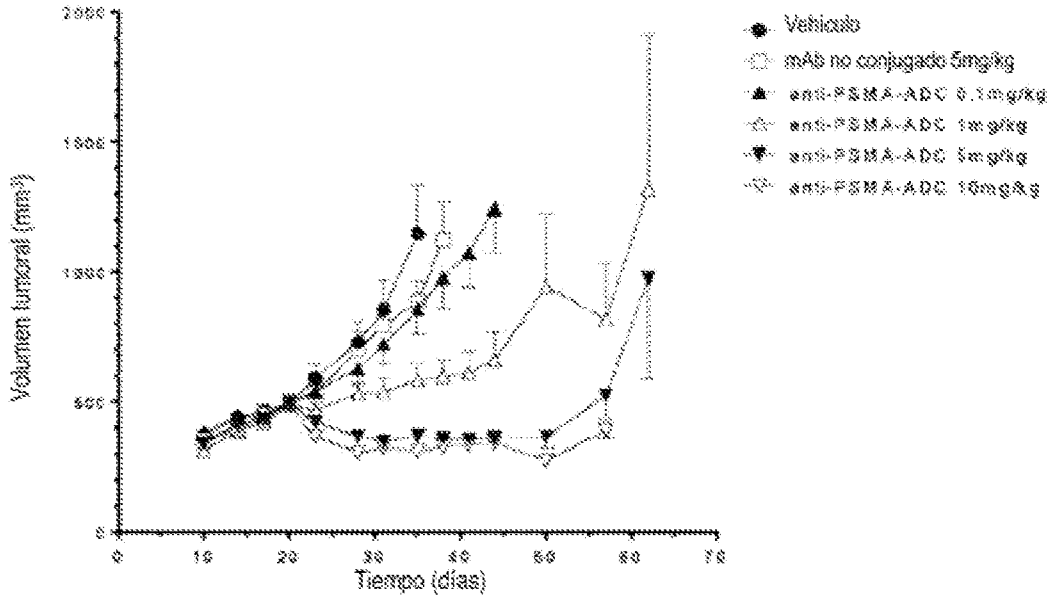


FIGURA 4B

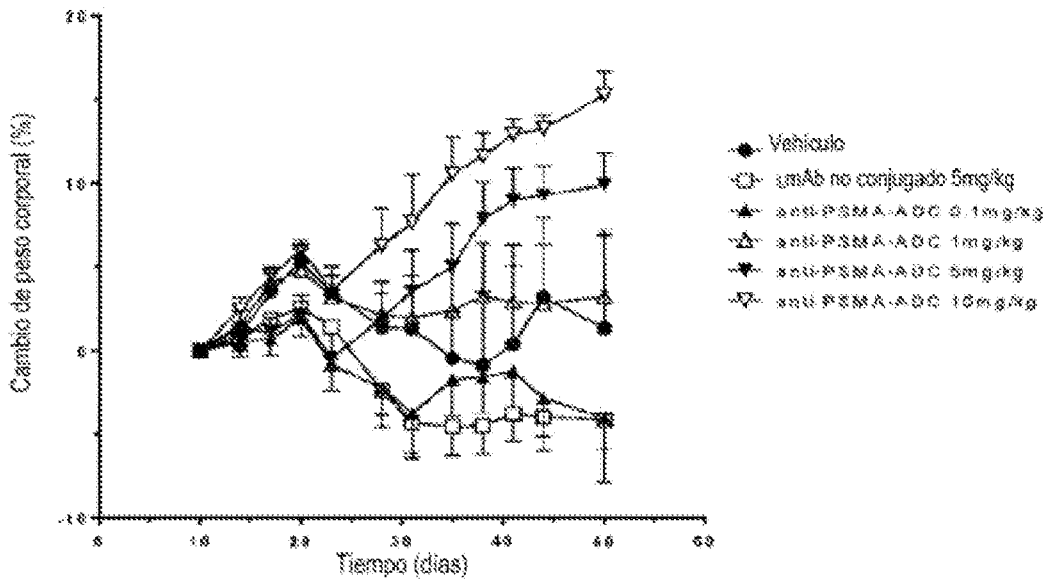


FIGURA 5A

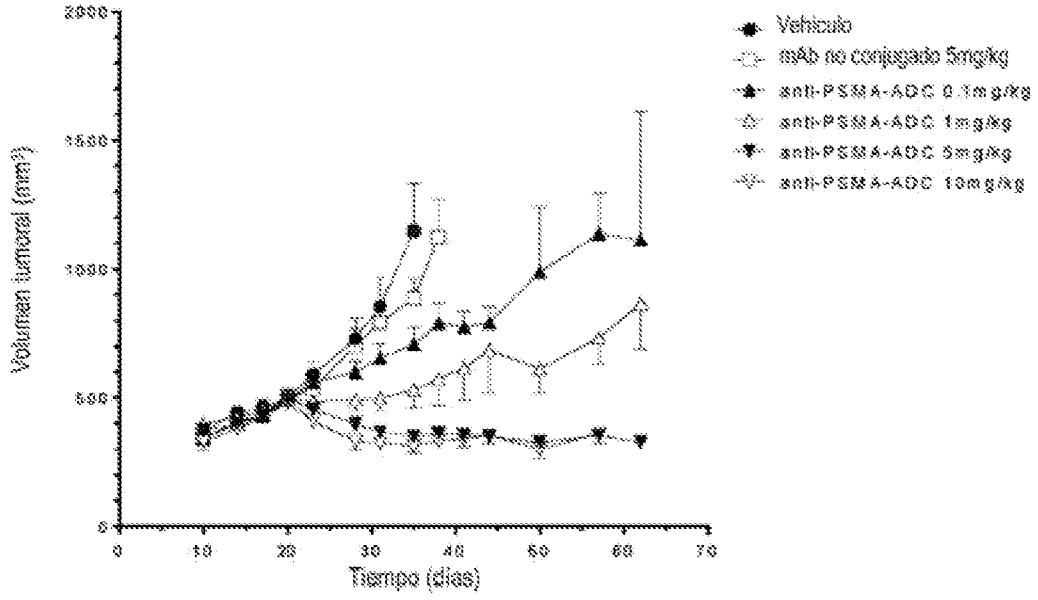


FIGURA 5B

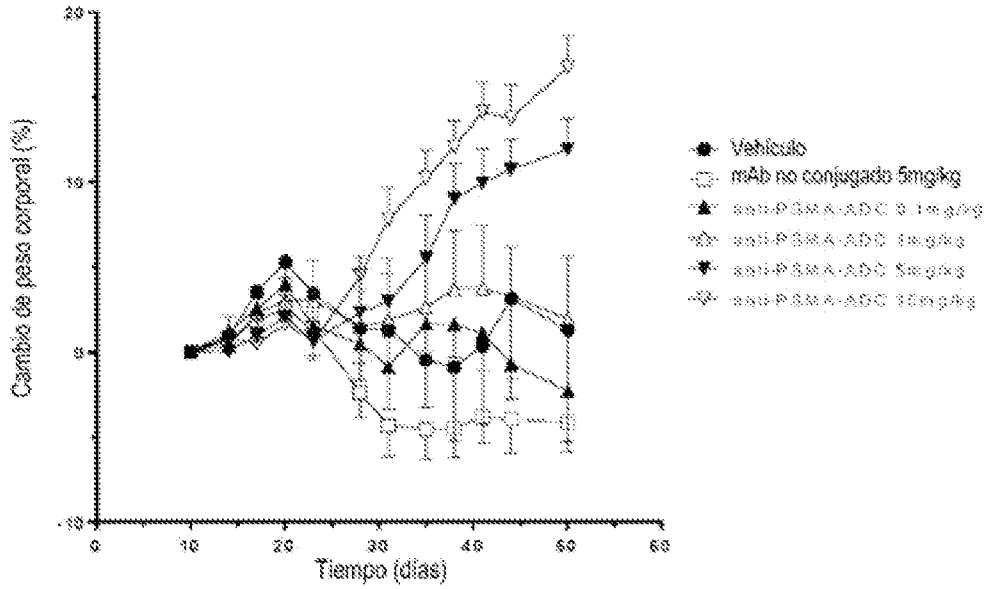


FIGURA 6A

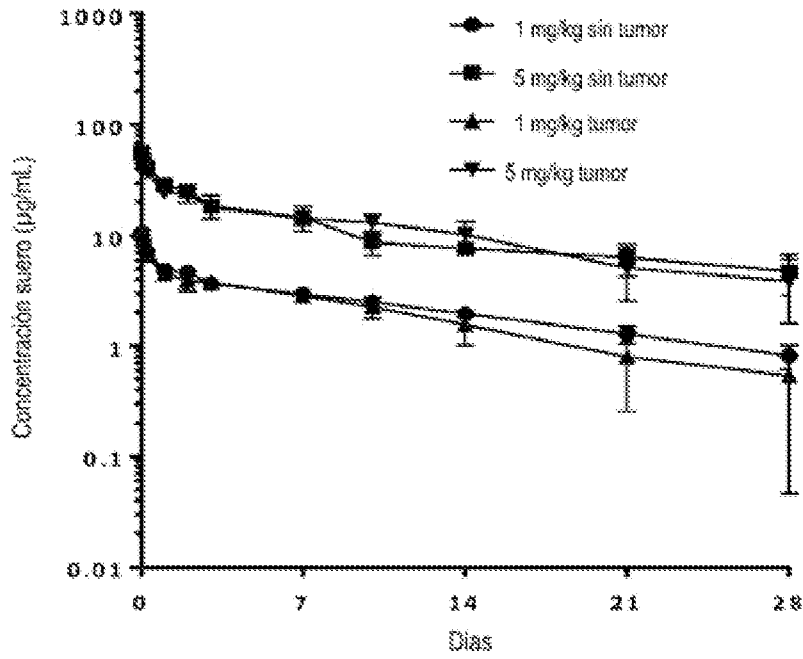


FIGURA 6B

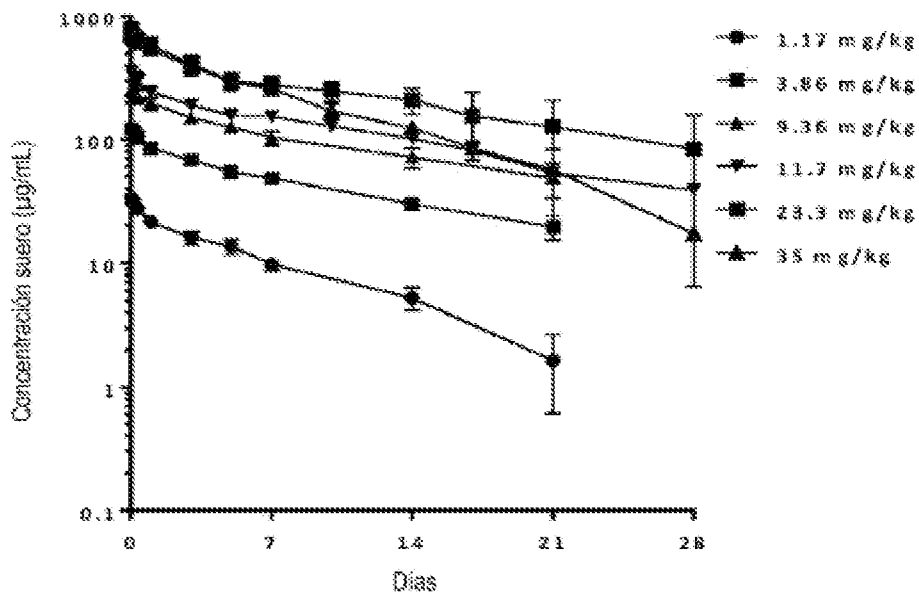


FIGURA 7A

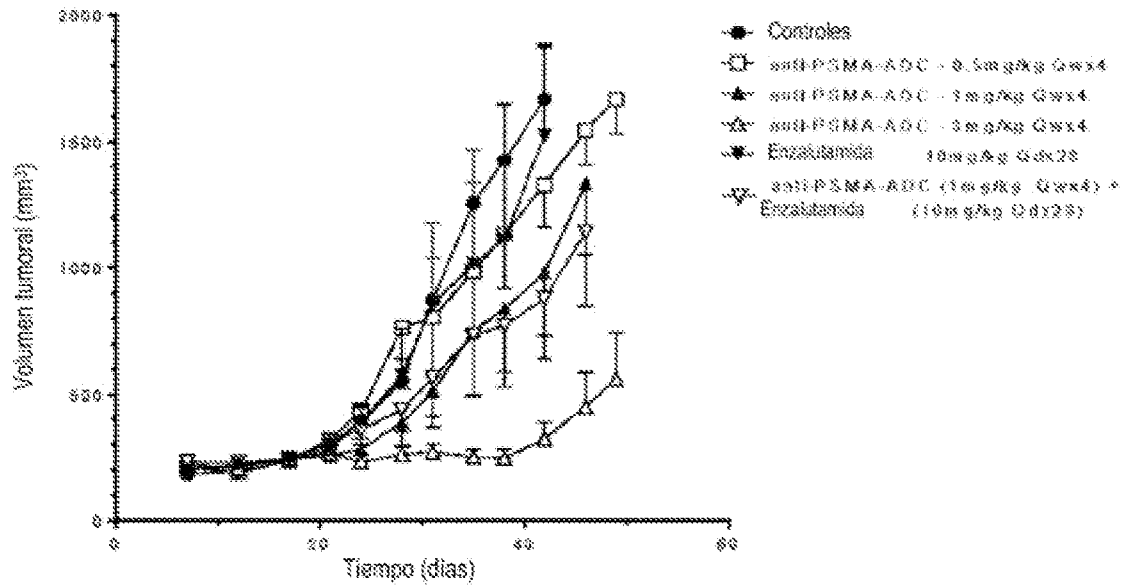


FIGURA 7B

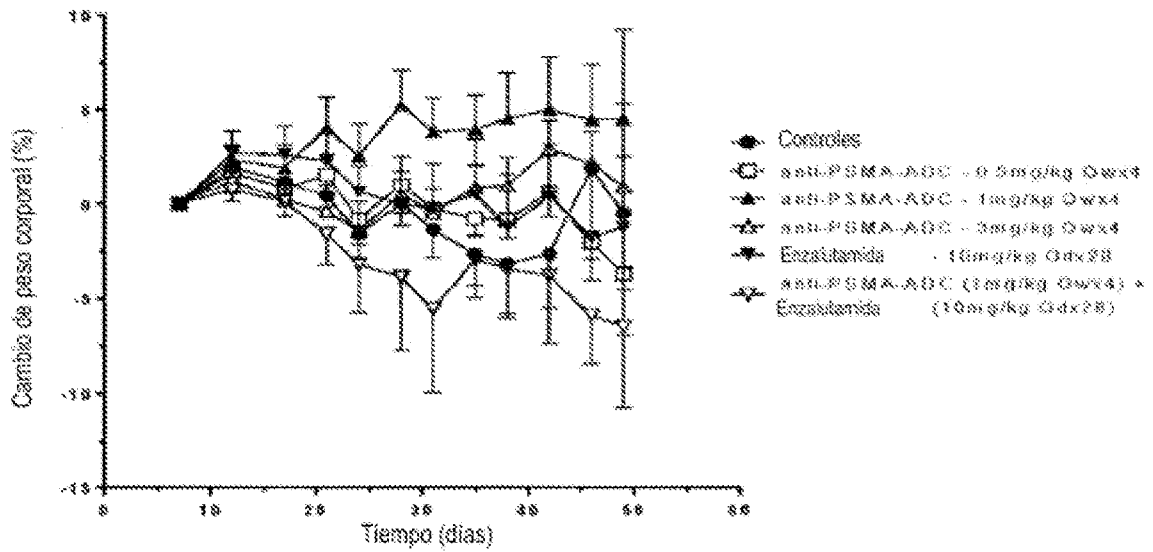


FIGURA 8A

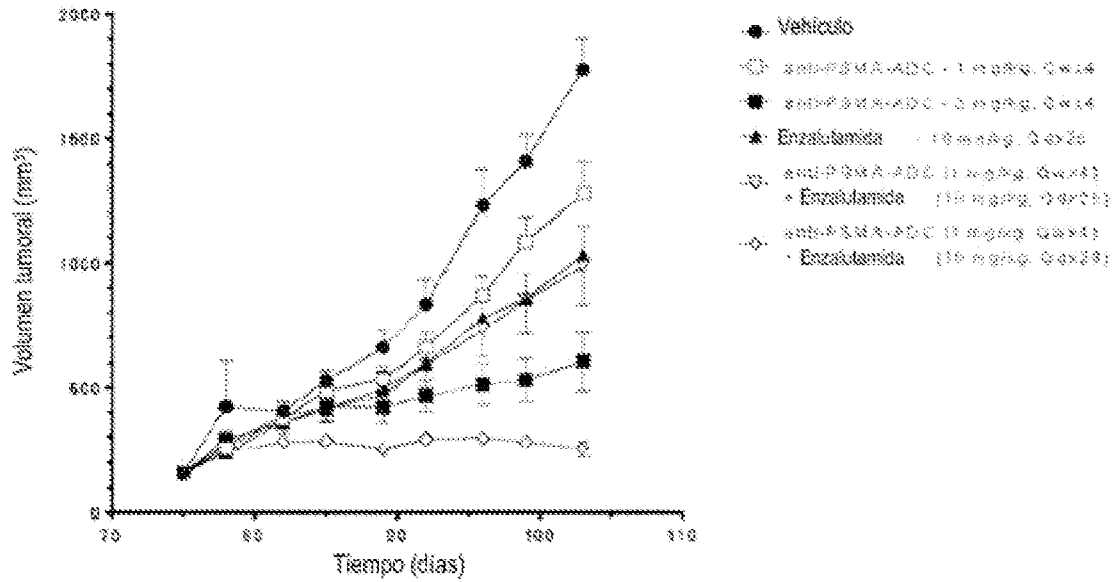


FIGURA 8B

