

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 492**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2017 PCT/GB2017/052448**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18033749**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017 E 17757849 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3500595**

(54) Título: **Anticuerpos anti-PSMA, usos de los mismos y conjugados de los mismos**

(30) Prioridad:

18.08.2016 GB 201614162

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2024

(73) Titular/es:

**ABZENA (UK) LIMITED (100.0%)
Babraham Research Campus, Babraham
Cambridge, Cambridgeshire CB22 3AT, GB**

(72) Inventor/es:

**HOLGATE, ROBERT GEORGE EDWARD y
HEARN, ARRON ROBERT**

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 983 492 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

Anticuerpos anti-PSMA, usos de los mismos y conjugados de los mismos

- 5 [0001] La presente solicitud se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a PSMA, a usos de los anticuerpos y a compuestos que incluyen los anticuerpos, por ejemplo, conjugados de los anticuerpos, por ejemplo, conjugados de anticuerpo y fármaco. Estos anticuerpos y conjugados encuentran uso en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades, en particular en cánceres, particularmente en cáncer de próstata.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- [0002] La especificidad de los anticuerpos por antígenos específicos en la superficie de células y moléculas diana, ha conducido a su uso extensivo como transportadores de una variedad de agentes diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, anticuerpos conjugados con etiquetas y grupos indicadores, tales como fluoróforos, radioisótopos y enzimas, encuentran uso en aplicaciones de etiquetado y obtención de imágenes, mientras que la conjugación con agentes citotóxicos y fármacos quimioterapéuticos permite el suministro dirigido de dichos agentes a estructuras o tejidos específicos, por ejemplo tipos de células o factores de crecimiento particulares, minimizando el impacto en el tejido sano normal y reduciendo significativamente los efectos secundarios asociados a los tratamientos de quimioterapia. Los conjugados de anticuerpo y fármaco tienen amplias aplicaciones terapéuticas posibles en varios campos de enfermedades.

- [0003] El cáncer de próstata, también conocido como carcinoma de próstata, es el desarrollo de cáncer en la próstata, una glándula del sistema reproductor masculino. A nivel mundial, es el segundo tipo de cáncer más común y la quinta causa de muerte relacionada con el cáncer en los hombres. La terapia de primera línea para el cáncer de próstata avanzado es la privación de andrógenos. Siguiendo su avance, la quimioterapia ofrece beneficios, pero las respuestas son transitorias y no existe ninguna terapia que haya demostrado mejorar la supervivencia más allá de la quimioterapia inicial. El cáncer de próstata metastásico no responde bien a la quimioterapia convencional. Por tanto, sigue siendo necesario mejorar las terapias. La expresión del antígeno prostático específico de membrana (PSMA, *Prostate Specific Membrane Antigen*) está muy asociada al cáncer de próstata y a otros tumores sólidos. El PSMA está presente en la superficie celular de algunas células epiteliales prostáticas normales, células tubulares proximales renales normales, intestino delgado proximal y algunos astrocitos (que se encuentran en el cerebro). El PSMA está muy regulado al alza/sobreexpresado en las células de cáncer de próstata (CaP). Los niveles de expresión del PSMA aumentan junto con el avance del cáncer de próstata y niveles altos del PSMA en el cáncer de próstata en estadio temprano predicen una mayor probabilidad de recurrencia. Una proporción significativa de tumores sólidos expresa PSMA en su neovasculatura tumoral, mientras que el endotelio vascular normal es negativo al PSMA. Se ha observado que el PSMA aumenta los folatos disponibles hidrolizando los folatos glutamados. Se ha planteado que el PSMA estimula el desarrollo del cáncer de próstata al aumentar los niveles de folato que las células cancerosas utilizan para sobrevivir y crecer.

- [0004] Anteriormente se han generado anticuerpos anti-PSMA (véase, por ejemplo, el documento WO98/03973) y se han preparado anticuerpos modificados con inmunogenicidad reducida en seres humanos (véase, por ejemplo, el documento WO2004/098535). Un ejemplo de un anticuerpo monoclonal de IgG desinmunizado que se une al PSMA es el J591. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del dominio variable del anticuerpo J591 murino se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 1, y la cadena ligera correspondiente se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del dominio variable del anticuerpo desinmunizado J591 se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 3, y la cadena ligera correspondiente se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 4. El anticuerpo J591 desinmunizado se ha utilizado en forma radiomarcada en la clínica y se ha demostrado que se tolera bien y que no es inmunogénico (véase Tagawa *et al.*, *Cancer*, 2010, **116**(4), 1075-1083).

- [0005] Otros ejemplos de anticuerpos que se unen al PSMA se desvelan en el documento WO03/034903 y sus miembros de familia, incluyendo el documento US 8,470,330B. Por ejemplo, el anticuerpo "AB-PG1-XG1-006" tiene secuencias de cadena pesada y ligera SEQ ID NO 15 y SEQ ID NO 17 en esas publicaciones (proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NO 13 y 14), y el anticuerpo "AB-PG1-XG1-026" tiene secuencias de cadena pesada y ligera SEQ ID NO 19 y SEQ ID NO 21 en esas publicaciones (proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NO 15 y 16).

- [0006] En el documento WO 2015/177360 se desvelan conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) en donde un fármaco enlazador se conjuga de forma específica con un anticuerpo a través de una cisteína diseñada, y su uso como medicamento, concretamente para el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias malignas hemáticas, en particular cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer urotelial, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de próstata y leucemia.

- [0007] En el documento WO 2015/057250 se desvelan composiciones y métodos relacionados con la inhibición de la proliferación de células que expresan el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o su destrucción. En el documento WO 2015/057250 también se desvela que las células que expresan PSMA pueden ponerse en contacto

con (i) un compuesto que aumente la expresión del PSMA en la superficie celular y (ii) un conjugado de ligando y PSMA. En el documento WO 2015/057250 también se desvela que las células que expresan PSMA pueden ponerse en contacto con (i) prednisona y (ii) un conjugado de ligando y PSMA. En el documento WO 2015/057250 también se desvela que las células que expresan PSMA pueden ponerse en contacto además con (iii) un compuesto que aumente la expresión de PSMA en la superficie celular.

5 [0008] En el documento WO 2009/017823 se desvelan métodos y composiciones que se relacionan con inmunotoxinas de diacuerpos de la toxina diftérica.

10 [0009] Además de tener buena afinidad de unión por la diana, baja unión inespecífica y baja inmunogenicidad, un anticuerpo que vaya a ser candidato como fármaco (ya sea solo o conjugado con otro componente activo) debe tener buena estabilidad. Es decir, debería tener una baja propensión a desnaturizarse o agregarse, o disociarse en fragmentos componentes. Dado este conjunto de propiedades exigentes, sigue siendo necesario desarrollar más anticuerpos anti-PSMA beneficiosos.

15 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

20 [0010] La presente invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

[0011] La presente invención también proporciona un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.

[0012] La presente invención también proporciona un vector de acuerdo con la reivindicación 3.

25 [0013] La presente invención también proporciona una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 4.

[0014] La presente invención también proporciona un conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5

30 [0015] La presente invención también proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 12, 13 y 14.

[0016] La presente invención también proporciona un método para detectar la presencia de antígeno PSMA en una muestra de acuerdo con la reivindicación 15.

35 [0017] Las CDR de la cadena pesada pueden designarse como CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. Según el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda), la CDRH1 se encuentra desde la posición H31 a la H35, la CDRH2 desde la H50 a la H65 y la CDRH3 desde la H95 a la H102.

40 [0018] Las CDR de la cadena ligera pueden designarse como CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. Según el sistema de numeración de Kabat, la CDRL1 se encuentra desde la posición L24 a la L34, la CDRL2 desde la L50 a la L56 y la CDRL3 desde la L89 a la L97.

45 [0019] Los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de la invención tienen una fuerte unión al PSMA, en particular, tienen una unión más fuerte que el anticuerpo J591 desinmunizado descrito anteriormente. Los anticuerpos con alta afinidad por su antígeno son ventajosos ya que pueden usarse terapéuticamente en pequeñas cantidades y conllevan un menor riesgo de efectos colaterales.

50 [0020] Asimismo, los anticuerpos preferidos y las porciones de unión a antígeno de la invención tienen buena estabilidad. Los anticuerpos con buena estabilidad son ventajosos ya que tienen menos propensión a desnaturizarse o agregarse, o a disociarse en fragmentos componentes. Como resultado, pueden permanecer en la circulación en una conformación originaria durante más tiempo. La fragmentación reducida es una ventaja ya que un anticuerpo fragmentado (o un conjugado de anticuerpo y fármaco) pierde su capacidad de unirse al antígeno diana. Los fármacos citotóxicos tienden a ser hidrófobos y, por tanto, muestran una tendencia a agregarse en solución. Una tendencia reducida a agregarse también es una ventaja para un conjugado de anticuerpo y fármaco. Los agregados pueden provocar una respuesta inmunitaria, es decir que pueden ser inmunogénicos. Un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de la invención, tiene buena estabilidad y una tendencia reducida a agregarse en solución.

60 [0021] Los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de la invención también muestran una buena eficacia de expresión. La eficacia de expresión del anticuerpo es un factor importante en la producción de un anticuerpo o de un conjugado de anticuerpo y fármaco. Por ejemplo, obtener una expresión estable y de alto rendimiento de un anticuerpo es importante para su producción con fines de uso diagnósticos o terapéuticos, en el que se requieren grandes cantidades de un anticuerpo incluso para realizar un ensayo clínico. El nivel de expresión de las cadenas ligeras o pesadas y su facilidad de manipulación durante la expresión y purificación pueden influir por tanto en la elección del anticuerpo seleccionado para la producción. Se prefieren los anticuerpos que se expresan bien con alta solubilidad y

baja propensión a agregarse.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

5 [0022]

La figura 1 (a) muestra la estructura del vector de expresión pANT para el dominio variable de cadena pesada (pANT17.2).

10 La figura 1 (b) muestra la estructura del vector de expresión pANT para el dominio variable de cadena ligera (pANT13.2).

La figura 2 muestra una comparación de la unión competitiva de AB-01 frente al anticuerpo AB-10 de la técnica anterior al antígeno PSMA según se analiza mediante FACS. AB-01 y AB-10 no están dentro del alcance de la invención reivindicada.

15 La figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos ilustrados en el presente documento. Las SEQ ID 1 a 4 y las SEQ ID 7 a 16 no están dentro del alcance de la invención reivindicada.

La figura 4 muestra las secuencias de ADN utilizadas para la expresión de los anticuerpos ilustrados en el presente documento. Las SEQ ID 17 a 20 y las SEQ ID 23 a 28 no están dentro del alcance de la invención reivindicada.

20 La figura 5 muestra las secuencias alineadas entre sí de algunos de los anticuerpos ilustrados en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0023] El anticuerpo de la presente invención (denominado 'AB-02') comprende una cadena pesada de dominio variable de SEQ ID NO:5 y una cadena ligera de dominio variable de SEQ ID NO:6.

25 [0024] Los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanizados que se unen al PSMA (por ejemplo, PSMA humano) con una constante de disociación en equilibrio (K_d) de $10^{-8}M$ o inferior, por ejemplo $10^{-9}M$ o inferior, por ejemplo $750 \times 10^{-12}M$ o inferior, por ejemplo $500 \times 10^{-12}M$ o inferior. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a una célula de cáncer de próstata humano.

30 [0025] Los anticuerpos de la invención tienen una estabilidad mejorada en comparación con determinados anticuerpos anti-PSMA humanizados (o desinmunizados) anteriores. Los anticuerpos de la invención tienen por tanto menos propensión a desnaturalizarse o agregarse, o disociarse en fragmentos componentes. Se plantea la hipótesis de que, como resultado, permanecen en la circulación en una conformación originaria durante más tiempo. Una tendencia reducida a agregarse es una ventaja particular para un conjugado de anticuerpo y fármaco y para los reactivos que producen estos conjugados; los fármacos citotóxicos tienden a ser hidrófobos y, por tanto, los reactivos de conjugación y los conjugados de anticuerpo y fármaco con fármacos citotóxicos tienen tendencia a agregarse en solución, lo que reduce significativamente su eficacia. Un anticuerpo fragmentado (incluso como parte de un conjugado de anticuerpo y fármaco) pierde su capacidad de unirse al antígeno diana. Por tanto, también resulta ventajoso un anticuerpo con una susceptibilidad reducida a la fragmentación.

40 [0026] Un anticuerpo de la invención puede tener una cadena pesada de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE. Se prefieren especialmente los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Como alternativa, puede tener una región constante de IgG alterada, por ejemplo, para aumentar o disminuir la unión a receptores de Fc o para aumentar o disminuir la unión al complemento, por ejemplo, la región constante de IgG puede ser IgG4k o IgG1k. Un anticuerpo de la invención puede tener una cadena ligera de anticuerpo que sea una cadena ligera kappa.

45 [0027] Un compuesto de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa (p. ej., un anticuerpo IgG4 o IgG1). Como alternativa, puede incluir sólo una porción de unión a antígeno. Por ejemplo, un compuesto de la invención puede ser un Fab, F(ab')₂, una cadena Fd, un fragmento Fv o un Fv monocatenario (scFv), un Fv unido por enlace disulfuro (sdFv), un fragmento que comprenda sólo un dominio V_H, incluidos nanocuerpos o fragmentos de camellos, llamas o similares. La invención también proporciona anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos (dos o más moléculas de anticuerpo diferentes unidas entre sí para dar dos o más especificidades diferentes) que incluyen al menos un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo como se describe anteriormente. La porción de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un minicuerpo compuesto por diferentes permutaciones de fragmentos scFv o diacuerpos y fragmentos Fc o dominios C_H tales como las proteínas de fusión scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, (Fab'ScFv)₂, scDiacuerpo-Fc, scDiacuerpo-C_H3, scFv-C_H3, scFv-C_H2-C_H3 y así sucesivamente. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por técnicas de escisión enzimática, sintéticas o recombinantes.

50 [0028] Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de la invención puede producirse mediante una línea celular de mamífero, especialmente células CHO o NS0. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal.

55 [0029] Los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención encuentran uso como agentes diagnósticos o terapéuticos *in vivo* e *in vitro*.

5 [0030] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos humanizados o las porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención. Por consiguiente, la invención también abarca los vectores de expresión recombinantes que incluyen los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención, y las células hospedadoras transfectadas con dichos vectores, al igual que los métodos de producción de los anticuerpos de la invención cultivando estas células hospedadoras. Por ejemplo, los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden codificarse por ácidos nucleicos de cadena pesada de IgG humana y cadena ligera kappa humana con secuencias como se expone en la SEQ ID NO: 21 (cadena pesada) o SEQ ID NO: 22 (cadena ligera), o sus variantes.

10 [0031] Por ejemplo, se puede determinar que una variante de ácido nucleico está dentro del alcance de la invención cuando incluye secuencias que contienen o que son sustancialmente idénticas a la SEQ ID NO: 21, por ejemplo, según lo determinado por su capacidad para hibridarse en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo un ácido nucleico de SEQ ID NO: 21. El término "hibridarse" se refiere a la unión, duplexación 15 (formación de dúplex) o hibridación de una molécula con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de biblioteca) compleja, en donde la secuencia de nucleótidos particular se detecta como mínimo aproximadamente 10 veces el fondo. Se seleccionarán condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo, que sean temperaturas entre 5 y 20 10 °C inferiores a las del punto de fusión térmica (Tm, *thermal melting*) para la secuencia específica a una fuerza iónica y a un pH definidos. Por ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden ser:

- formadida desionizada al 50 %
- 2x solución salina de citrato de sodio (SSC)*
- tampón de Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ 50 mM; pH 7,0
- EDTA 1 mM
- ADN/ARN diana (1 mg/ml cada uno)
- sonda (aprox. 20 - 200 ng/ml)

25 Temperatura: de 37 a 42 °C; Tiempo de hibridación: 5 minutos - 16 horas

30 *SCS: 1x SSC = NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM; pH 7,0.

CONJUGADOS

35 [0032] La invención proporciona además un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, Fab, de acuerdo con la invención conjugado, a través de un enlazador, a una carga útil, que puede ser otra molécula funcional, por ejemplo, un agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado, y/o un polímero terapéutico. Puede haber una única molécula de otra molécula funcional, o puede haber dos o más moléculas. A menudo se prefiere que los conjugados de anticuerpo y fármaco contengan múltiples copias del fármaco. La molécula funcional puede ser, por 40 ejemplo, otro péptido o proteína, p.ej. un fragmento Fab'. Se prefiere la inclusión de una o más moléculas de fármaco, por ejemplo, de un agente citotóxico o de una toxina. Las auristatinas y los maitansinoïdes son fármacos citotóxicos habituales. Los agentes de etiquetado (que debe entenderse que incluyen agentes de obtención de imágenes) pueden incluir, por ejemplo, un radionúclido, un agente fluorescente (por ejemplo, una sonda fluorescente derivatizada con amina tal como 5-dimetilaminonaftaleno-1-(N-(2-aminoetil))sulfonamida-dansiletilendiamina, Oregon Green® 488 45 cadaverina (número de catálogo 0-10465, Molecular Probes), dansil cadaverina, N-(2-aminoetil)-4-amino-3,6-disulfo-1,8-naftalimida, sal dipotásica (etilendiamina amarilla de lucifer), o etilendiamina rodamina B (número de catálogo L 2424, Molecular Probes), o una sonda fluorescente derivatizada con tiol, por ejemplo BODIPY® FL L-cistina (número de catálogo B-20340, Molecular Probes). El agente de etiquetado también puede ser un colorante, un agente de contraste, un agente bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador o una nanopartícula. También puede 50 utilizarse biotina.

[0033] En algunas realizaciones, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se conjuga con un agente terapéutico. Un "agente terapéutico", como se utiliza en el presente documento, es un átomo, una molécula, o un compuesto que es útil en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por PSMA o que se caracteriza 55 por una mayor expresión de PSMA. Como ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen, aunque sin limitación, fármacos, agentes quimioterápicos, anticuerpos terapéuticos y fragmentos de anticuerpos, toxinas, radioisótopos, enzimas (por ejemplo, enzimas que escinden profármacos a un agente citotóxico en el sitio de unión de la construcción de unión a antígeno), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos antisentido, quelantes, compuestos de boro, agentes y colorantes fotoactivos, y nanopartículas.

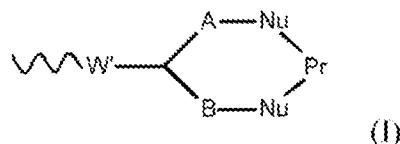
60 [0034] En algunas realizaciones, un enfoque terapéutico incluye radioinmunoterapia a través de la fijación de un radiomarcador apropiado, tal como, Yodo-131, un emisor beta, tal como, Itrio-90, Lutecio-177, Cobre-67, Astatina-211, Plomo-212/Bismuto-212, Actinio-225/Bismuto-213 y Torio, que puede causar daño y muerte celular en un tejido específico.

65 [0035] En algunas realizaciones, en aplicaciones terapéuticas, como transportadores de fármacos, se utilizan

- nanopartículas que, cuando se conjugan con un anticuerpo o con una porción de unión a antígeno del mismo, suministran agentes quimioterápicos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, toxinas, o cualquier otro agente citotóxico o contra el cáncer conocido en la técnica, a las células cancerosas que sobreexpresan el PSMA. Cualquiera de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento puede conjugarse además con uno o más agentes terapéuticos adicionales, marcadores detectables, nanopartículas, transportadores o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo puede radiomarcarse con Yodo-131 y conjugarse con un transportador lipídico, de modo que el conjugado de anti-PSMA y lípido forme una micela. La micela puede incorporar uno o más marcadores terapéuticos o detectables. Como alternativa, además del transportador, la construcción de unión a antígeno puede radiomarcarse con Yodo-131 I (por ejemplo, en un resto de tirosina) y conjugarse con un fármaco (por ejemplo, en el grupo amino épsilon de un resto de lisina), y el transportador puede incorporar un agente terapéutico o marcador detectable adicional.
- [0036]** En algunas realizaciones, las porciones de unión a antígeno de la invención se conjugan con un agente terapéutico. Aunque estas porciones de unión al antígeno pueden tener una semivida media en circulación más corta en comparación con un anticuerpo de longitud completa, en algunas realizaciones, estos formatos pueden mostrar una mejor penetración tumoral debido a su tamaño más pequeño y ser terapéuticamente eficaces cuando están equipados adecuadamente con un fármaco citotóxico o radioisótopo. En algunas realizaciones, se puede emplear un enfoque de conjugado de anticuerpo y fármaco. En algunas realizaciones, el tratamiento con estos fragmentos equipados con un fármaco citotóxico o un radionúclido produce menos toxicidad inespecífica, ya que se eliminarán del cuerpo más rápidamente.
- [0037]** En algunas realizaciones, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se conjuga con un marcador detectable. Como se utiliza en el presente documento, un "marcador detectable" incluye un átomo, una molécula o un compuesto que es útil en el diagnóstico, en la detección o visualización de una ubicación y/o cantidad de un antígeno de PSMA en una célula, tejido, órgano o similar. Los marcadores detectables que pueden utilizarse de acuerdo con las realizaciones del presente documento incluyen, aunque sin limitación, sustancias radiactivas (por ejemplo, radioisótopos, radionúclidos, radiomarcadores o radiotrazadores), colorantes, agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes, compuestos o moléculas bioluminiscentes, enzimas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos). Asimismo, se sabe en la técnica, que algunas nanopartículas, por ejemplo, los puntos cuánticos y las nanopartículas metálicas, son adecuados para su uso como agente de detección. En algunas realizaciones, el marcador detectable es verde de indocianina (ICG, *IndoCyanine Green*), Circonio-89, IR800 y/u otro colorante del infrarrojo cercano.
- [0038]** Como ejemplos de sustancias radiactivas que pueden utilizarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones del presente documento se incluyen, aunque sin limitación, ^{18}F , ^{18}F -FAC, ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , ^{99m}Tc , ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Prm , ^{153}Sm , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra y ^{225}Ac . Como ejemplos de sustancias de iones paramagnéticos que pueden utilizarse como marcadores detectables se incluyen, aunque sin limitación, iones de metales de transición y lantánidos (por ejemplo metales que tienen números atómicos de 6-9, 21-29, 42, 43, 44 o 57-71). Estos metales incluyen iones de Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu.
- [0039]** Como ejemplos de agentes de contraste que pueden utilizarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación se incluyen, aunque sin limitación, bario, diatrizoato, aceite etiodulado, citrato de galio, ácido yocármico, ácido yodocetálmico, yodamida, adipiodona, ácido yodoxámico, yogulamida, yohexilo, yopamidol, ácido yopanoico, ácido yoprocémico, ácido yosefámico, ácido yosérico, meglumina de yosulamida, ácido yosemético, yotasul, ácido yotérico, ácido yotalámico, ácido yotróxico, ácido yoxáglico, ácido yoxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodonina, cloruro de talio, o combinaciones de los mismos.
- [0040]** Como compuestos o moléculas y colorantes bioluminiscentes y fluorescentes que pueden utilizarse como marcadores de detección de acuerdo con las realizaciones de la divulgación se incluyen, aunque sin limitación, fluoresceína, isoftiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), OREGON GREEN™, rodamina, rojo Texas, isoftiocinato de tetrarrodamina (TRITC, *tetrarhodamine isothiocyanate*), Cy3, Cy5 y similares, marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*), ficoeritrina y similares), compuestos fluorescentes autodesactivados que se activan con proteasas asociadas a tumores, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares), nanopartículas, biotina, digoxigenina o combinación de las mismas.
- [0041]** Como enzimas que pueden utilizarse como marcadores detectables de acuerdo con las realizaciones de la divulgación se incluyen, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa o β -lactamasa. Dichas enzimas pueden utilizarse junto con un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminógeno para generar una señal detectable.
- [0042]** Los enlazadores adecuados para unir la carga útil al anticuerpo o a su porción de unión a antígeno son los que se describen más adelante en el apartado de Reactivos de Conjugación. El enlazador es ventajosamente

degradable, como se describe a continuación. En algunas realizaciones preferidas, el enlazador incluye un polímero, como se describe a continuación.

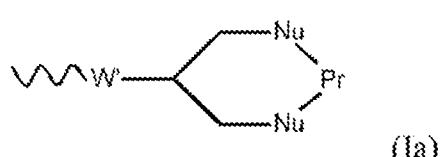
- 5 [0043] Los conjugados preferidos de acuerdo la invención, son aquellos en los que el enlace de la carga útil al anticuerpo o a su porción de unión a antígeno se realiza a través de una porción de enlace que tiene la fórmula general:



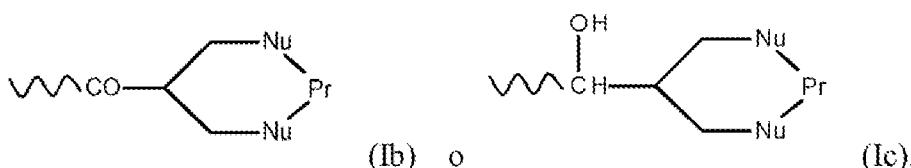
- 10 en la que Pr representa dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, cada Nu representa un nucleófilo presente en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo, o unido a estos, cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquíleno o alquenileno C₁₋₄, y W' representa un grupo electroatravayente o un grupo obtenido por reducción de un grupo electroatravayente.

- 15 [0044] Un grupo electroatravayente W' puede ser, por ejemplo, un grupo ceto -CO-, un grupo éster -O-CO- o un grupo sulfona -SO₂-. Preferentemente, W' representa uno de estos grupos o un grupo que puede obtenerse por reducción de uno de estos grupos como se describe a continuación. Preferentemente W' representa un grupo ceto o un grupo que puede obtenerse por reducción de un grupo ceto, especialmente un grupo CH.OH.

- 20 [0045] Preferentemente la agrupación tiene la fórmula:

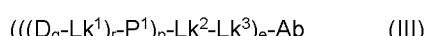


en especial



- 25 [0046] Los grupos nucleófilos en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo, los proporcionan, por ejemplo, los restos de cisteína, lisina o histidina, y Nu puede ser, por ejemplo, un átomo de azufre o un grupo amina. En una realización preferida de la invención, cada Nu representa un átomo de azufre presente en un resto de cisteína presente en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo de acuerdo con la invención contendrá generalmente cuatro enlaces disulfuro entre cadenas. Cada uno de estos puede reducirse para proporcionar grupos tiol libres que actúan como nucleófilos. Si cada uno de estos enlaces disulfuro forma puentes como se muestra en las fórmulas I anteriores, se producirá un conjugado con una relación de anticuerpo y fármaco (DAR, *drug-antibody ratio*) de 4. En otra realización, cada Nu representa un grupo imidazol presente en un resto de histidina, presente en una etiqueta de polihistidina unida a dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo.

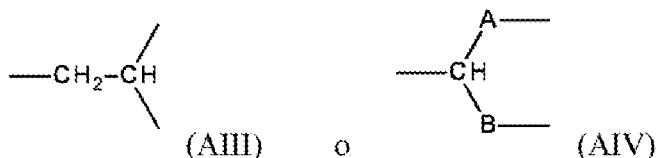
- [0047] Los anticuerpos de la invención pueden tener, por ejemplo, la fórmula general:



- 40 en la que D representa la carga útil;
q representa un número entero de 1 a 10;
Lk¹ representa un enlazador;
r representa un número entero de 1 a 10;
45 P¹ representa un enlace o un grupo c-valente -P²-NH- donde c es de 2 a 11 y P² es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH₂-CH₂- o unidad de etilenglicol -O-CH₂-CH₂-;
p representa un número entero de 1 a 10;
Lk² representa un enlace o un enlazador d-valente donde d es de 2 a 11 y que consta de 1 a 9 restos de aspartato y/o glutamato;
50 Lk³ representa un enlazador de la fórmula general:

-CO-Ph-Y-Z- (AII)

5 en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; Y representa un grupo CO o un grupo CH.OH; y Z representa un grupo de fórmula:



10 en la que cada uno de A y B representa un grupo alquíleno o alquenileno C₁₋₄;

Ab representa el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención, que se une a Lk³ a través de dos átomos de azufre procedentes de un enlace disulfuro en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo; y
e representa un número entero de 1 a s, donde s es el número de enlaces disulfuro presentes en el anticuerpo o en la porción de unión al antígeno del mismo antes de conjugarse con Lk³.

15 [0048] Los significados de q, r, e, c y d determinan el número total de grupos D presentes. Este número puede ser, por ejemplo, de hasta 20, por ejemplo, de hasta 15, por ejemplo, de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4.

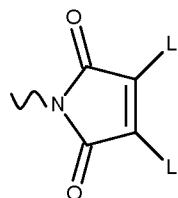
REACTIVOS DE CONJUGACIÓN

20 [0049] Los conjugados de acuerdo con la invención pueden prepararse haciendo reaccionar un reactivo de conjugación con un anticuerpo o con una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención. La conjugación puede realizarse, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera, pero preferentemente se realiza mediante acoplamiento químico. Normalmente, el reactivo de conjugación comprenderá un grupo funcional capaz de reaccionar de manera covalente con al menos un electrófilo o, especialmente, nucleófilo presente en el anticuerpo o en una porción de unión a antígeno del mismo, cuyo grupo funcional está unido a una carga útil mediante un enlazador. Se conocen muchos reactivos de conjugación que pueden utilizarse para conjugar una carga útil con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, y cualquiera de estos puede utilizarse para preparar un conjugado de acuerdo con la invención.

30 [0050] Por ejemplo, el reactivo puede contener un grupo maleimida, un grupo de química clic, por ejemplo un grupo azida o alquino, un grupo amina, un grupo carboxilo o un grupo éster activo. Otros enfoques posibles incluyen el uso de anticuerpos que se han diseñado de manera recombinante con un aminoácido específicamente para la conjugación, tal como cisteínas o aminoácidos no naturales diseñados y conjugación enzimática a través de una reacción enzimática específica tal como con transglutaminasa. El sitio de reacción en el anticuerpo o en una porción de unión a antígeno del mismo puede ser de naturaleza nucleófila o electrófila. Los sitios de conjugación comunes están en los restos de aminoácido de lisina o cisteína o en los residuos de hidrato de carbono. Como alternativa, la conjugación puede producirse en una etiqueta de polihistidina que se haya unido al anticuerpo o a una porción de unión a antígeno del mismo.

40 [0051] Un reactivo de conjugación es ventajosamente capaz de reaccionar con un nucleófilo en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo y, por lo tanto, unirse químicamente al mismo. Como tal, el reactivo de conjugación incluye normalmente al menos un grupo saliente que se pierde en la reacción con un nucleófilo. El reactivo de conjugación puede incluir, por ejemplo, dos o más grupos salientes. Preferentemente, el reactivo de conjugación es capaz de reaccionar con dos nucleófilos. Ventajosamente, el reactivo de conjugación comprende al menos dos grupos salientes. Si hay dos o más grupos salientes, estos pueden ser iguales o diferentes. Como alternativa, un reactivo de conjugación puede contener un grupo sencillo que es químicamente equivalente a dos grupos salientes y cuyo grupo sencillo puede reaccionar con dos nucleófilos.

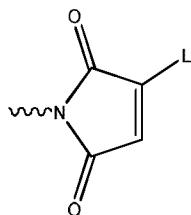
50 [0052] Un grupo de reactivos se basa en las bis-halo- o bis-tio-maleimidas y derivados de las mismas como se describe en Smith *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 1960-1965 y Schumacher *et al.*, Bioconj. Chem., 2011, 22, 132-136. Estos reactivos contienen la agrupación funcional:



en la que cada L es un grupo saliente (*leaving*). El átomo de nitrógeno del anillo de maleimida puede llevar la carga útil, de manera directa o indirecta.

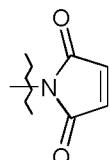
5

[0053] De forma similar, pueden utilizarse maleimidas que contengan un grupo sencillo saliente L:



10 De nuevo, el átomo de nitrógeno del anillo de maleimida lleva la carga útil, de manera directa o indirecta.

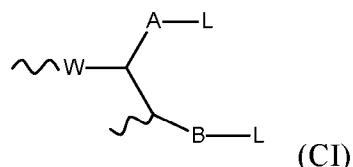
[0054] También pueden utilizarse maleimidas que no tengan un grupo saliente:



15

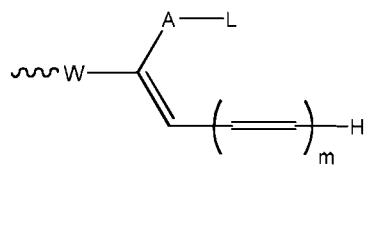
De nuevo, el átomo de nitrógeno del anillo de maleimida lleva la carga útil, de manera directa o indirecta.

[0055] En una realización preferida, un reactivo de conjugación contiene la agrupación funcional:



20

en la que W representa un grupo electroatrayente, por ejemplo un grupo ceto, un grupo éster -O-CO-, un grupo sulfona -SO₂- o un grupo ciano; A representa una cadena de alquíleno o alquenileno C₁₋₅; B representa un enlace o una cadena de alquíleno o alquenileno C₁₋₄; y cada L representa independientemente un grupo saliente, o ambos L representan conjuntamente un grupo saliente. Los reactivos de este tipo se describen en Bioconj. Chem 1990(1), 36-50, Bioconj. Chem 1990(1), 51-59, y J. Am. Chem. Soc. 110, 5211-5212. Cuando los reactivos que contienen dichos grupos reaccionan con el anticuerpo o con una porción de unión a antígeno del mismo, un primer grupo saliente L se pierde para formar *in situ* un reactivo de conjugación que contiene una agrupación funcional de fórmula:



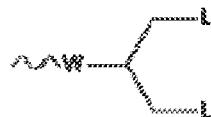
30

en la que m es 0 a 4, que reacciona con un primer nucleófilo. A continuación, se pierde el segundo grupo saliente L y

se produce la reacción con un segundo nucleófilo. Como alternativa al uso de un reactivo que contenga la agrupación funcional Cl como material de partida, podrán utilizarse reactivos que contengan la agrupación funcional Cl' como material de partida.

5 [0056] Preferentemente W representa un grupo ceto. Preferentemente A representa -CH₂- y B representa un enlace.

[0057] Las agrupaciones funcionales particularmente preferidas de fórmula Cl y Cl' tienen las fórmulas:



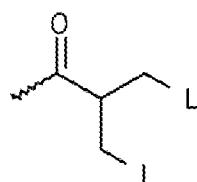
(Cl'a) o



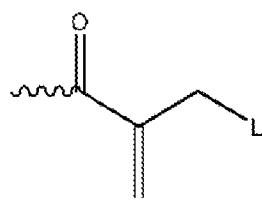
(Cl'a')

10

[0058] Por ejemplo, el grupo puede tener la fórmula:



(Cl'b) o



(Cl'b')

15

[0059] Otro grupo de reactivos de conjugación contiene la agrupación funcional:



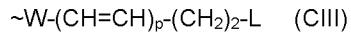
en la que W tiene el significado y los significados preferidos proporcionados anteriormente, y

20

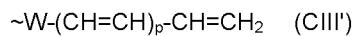
cada R⁴ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄, R^{4'} representa un átomo de hidrógeno y cada L representa independientemente un grupo saliente o ambos L juntos representan un grupo saliente; o
cada R⁴ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄, L representa un grupo saliente y R^{4'} y L' juntos representan un enlace.

25

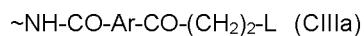
[0060] Otro grupo de reactivos de conjugación incluye la agrupación funcional:



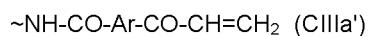
30 o



en la que W tiene el significado y los significados preferidos proporcionados anteriormente y p representa 0 o un número entero de 1 a 4, preferentemente 0. Un reactivo especialmente preferido de este tipo incluye la agrupación funcional:

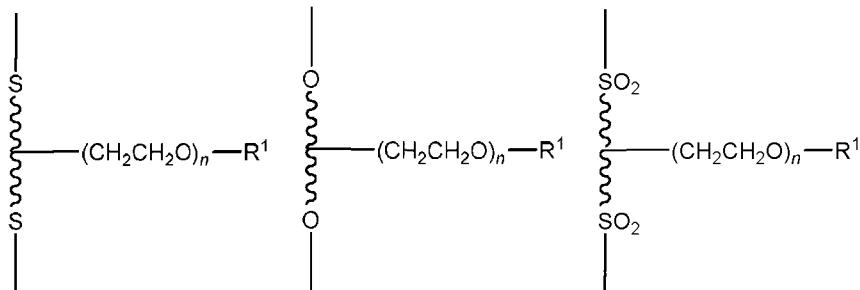


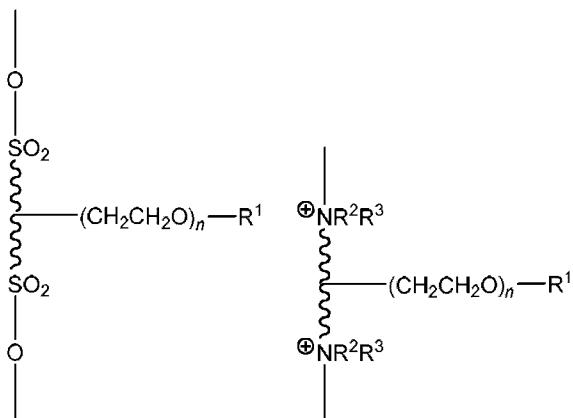
40 o



en la que Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido, especialmente fenilo.

- [0061]** Un grupo saliente L puede ser, por ejemplo, -SP, -OP, -SO₂P, -OSO₂P, -N⁺PR²R³, halógeno, -OØ, en el que P representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₆), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquilfenilo C₁₋₆) o es un grupo que incluye una porción -(CH₂CH₂O)_{n-} en la que n es un número de dos o más, especialmente 6 o más, y cada uno de R² y R³ representa independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₄, o un grupo P, y Ø representa un grupo arilo sustituido, especialmente fenilo, que contiene al menos un sustituyente, por ejemplo -CN, -CF₃, -NO₂, -CO₂R', -COH, -CH₂OH, -COR', -OR', -OCOR', -OCO₂R', -SR', -SOR', -SO₂R', -NHCOR', -NR'COR', -NHCO₂R', -NR'CO₂R', -NO, -NHOH, -NR'OH, -CH=N-NR'COR', -N⁺R'₃, halógeno, especialmente cloro o, especialmente, flúor, -C=CR' y -CH=CR'₂, en las que cada R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₆), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquilfenilo C₁₋₆). Se prefiere la presencia de sustituyentes electroatrayentes.
- [0062]** Los reactivos de conjugación en los que P representa un grupo que incluye una porción -(CH₂CH₂O)_{n-} en la que n es un número de dos o más son el tema de nuestra solicitud en tramitación GB 1418186.1, a partir de la cual, la PCT/GB2015/052952, ahora publicada como WO2016/059377, reivindica prioridad. Esta solicitud desvela lo siguiente:
- "El grupo saliente puede incluir, por ejemplo -(CH₂CH₂O)_{n-}R¹ donde R¹ es un grupo de protección. Puede utilizarse una muy amplia variedad de grupos de protección. R¹ puede ser, por ejemplo un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, especialmente un grupo alquilo C₁₋₄, particularmente un grupo metilo o un grupo arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo un grupo fenilo opcionalmente sustituido, por ejemplo un grupo tolilo. Como alternativa, el grupo de protección puede incluir un grupo funcional tal como un grupo carboxilo o un grupo amina. Tales grupos de protección pueden tener, por ejemplo, la fórmula -CH₂CH₂CO₂H o -CH₂CH₂NH₂, y pueden prepararse funcionalizando la unidad terminal de una cadena -(CH₂CH₂O)_{n-}. Como alternativa, en lugar de llevar un grupo protector terminal, el grupo -(CH₂CH₂O)_{n-} puede tener dos puntos de unión en el reactivo de conjugación de manera que químicamente esté presente el equivalente de dos grupos salientes, capaces de unirse a dos nucleófilos.
- La porción -(CH₂CH₂O)_{n-} del grupo saliente está basada en PEG, polietilenglicol. El PEG puede ser de cadena lineal o ramificada y puede derivatizarse o funcionalizarse de cualquier forma. n es un número de 2 o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. Por ejemplo, n puede ser de 5 a 9. Como alternativa, n puede ser un número de 10 o más. No hay un límite superior particular para n. n puede ser, por ejemplo, 150 o menos, por ejemplo 120 o menos, por ejemplo 100 o menos. Por ejemplo n puede ser de 2 a 150, por ejemplo de 7 a 150, por ejemplo de 7 a 120. La porción de PEG -(CH₂CH₂O)_{n-} de un grupo saliente puede tener un peso molecular de, por ejemplo, 1 a 5 kDa; puede ser, por ejemplo, de 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa o 5 kDa. Si se desea, un grupo saliente puede contener dos o más porciones -(CH₂CH₂O)_{n-} separadas por uno o más espaciadores.
- Un grupo saliente en un reactivo de acuerdo con la invención tiene adecuadamente la fórmula -SP, -OP, -SO₂P, -OSO₂P, -N⁺PR²R³, en la que P es un grupo que incluye una porción -(CH₂CH₂O)_{n-} y cada uno de R² y R³ representa independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₄, o un grupo P. Preferentemente cada uno de R² y R³ representa un grupo alquilo C₁₋₄, especialmente un grupo metilo, o, especialmente, un átomo de hidrógeno. Como alternativa, el reactivo de conjugación puede incluir un grupo de fórmula -S-P-S-, -O-P-O-, -SO₂-P-SO₂-, -OSO₂-P-OSO₂-, y -N⁺R²R³-P-N⁺R²R³-. Los grupos específicos de este tipo incluyen -S-(CH₂CH₂O)_{n-}S-, -O-(CH₂CH₂O)_{n-}O-, -SO₂-(CH₂CH₂O)_{n-}SO₂-, -OSO₂-(CH₂CH₂O)_{n-}OSO₂-, o -N⁺R²R³-(CH₂CH₂O)_{n-}N⁺R²R³-. También pueden incluir grupos del tipo:



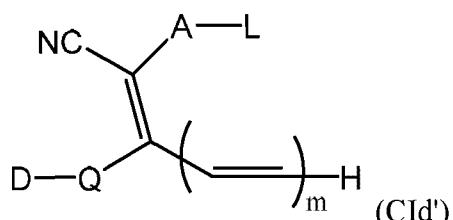
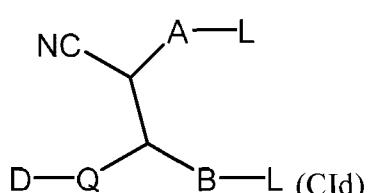
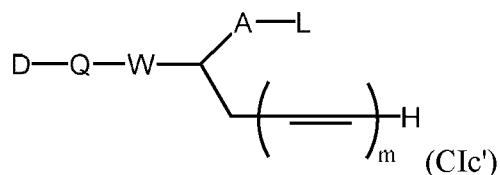
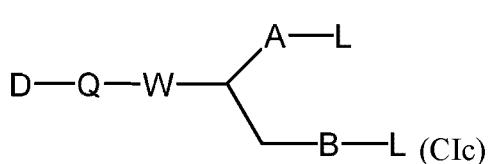


donde el grupo $-(CH_2CH_2O)_n-$ es transportado por cualquier grupo enlazador adecuado, por ejemplo un grupo alquilo. Estos grupos divalentes son químicamente equivalentes a dos grupos salientes capaces de reaccionar con 5 dos nucleófilos.

[0063] Un grupo saliente L especialmente preferido presente en un reactivo de conjugación es -SP o $-SO_2P$, especialmente $-SO_2P$. Dentro de este grupo, una realización preferida es cuando P representa un grupo fenilo o, especialmente, un grupo tosilo. Otra realización preferida es cuando P representa un grupo que incluye una porción 10 $-(CH_2CH_2O)_n-$, especialmente uno en el que n tiene uno de los valores mencionados anteriormente, especialmente 7. Un grupo saliente L especialmente preferido es $-SO_2-(CH_2CH_2O)_n-H/Me$, especialmente $-SO_2-(CH_2CH_2O)_7-H/Me$. A lo largo de esta memoria descriptiva, cualquier referencia a un grupo saliente L se debe entender que incluye una referencia específica a estos grupos preferidos, especialmente $-SO_2-(CH_2CH_2O)_n-H/Me$, y más especialmente $-SO_2-(CH_2CH_2O)_7-H/Me$.

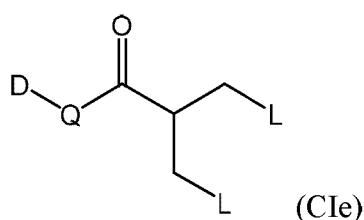
[0064] Los reactivos de conjugación pueden contener más de un grupo funcional. Por ejemplo, un reactivo puede 15 contener una agrupación funcional del tipo C anterior en un extremo de la molécula, y una o más agrupaciones funcionales adicionales, que sea capaz de conjugarse con el anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo o con cualquier otra molécula, en cualquier lugar de la molécula. Tales estructuras se describen, por ejemplo, 20 en Belcheva et al, J. Biomater. Sci Polymer Edn. 9(3), 207-226 y son útiles en la síntesis de conjugados que contienen múltiples proteínas.

[0065] Los reactivos de conjugación que contienen la unidad de fórmula Cl/Cl' pueden tener la fórmula (Clc) o (Clc') 25 o, donde W representa un grupo ciano, (Clid) o (Clid'):

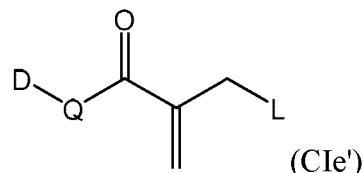


en el que D representa una carga útil y Q representa un grupo enlazador.

[0066] Los reactivos de conjugación preferidos incluyen los siguientes:

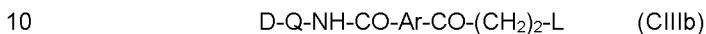


o

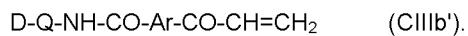


5

o



o



en el que D representa la carga útil y Q representa un grupo enlazador.

[0067] El reactivo de conjugación puede tener, por ejemplo, la fórmula general:



en la que D representa la carga útil;

q representa un número entero de 1 a 10;

LK¹ representa un enlazador;

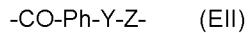
25 r representa un número entero de 1 a 10;

P¹ representa un enlace o un grupo c-valente -P²-NH- donde c es de 2 a 11 y P² es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH₂-CH₂- o unidad de etilenglicol -O-CH₂-CH₂-;

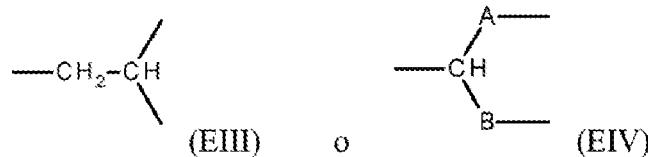
z representa un número entero de 1 a 10;

30 LK² representa un enlace o un enlazador d-valente donde d es de 2 a 11 y que consta de 1 a 9 restos de aspartato y/o glutamato;

LK³ representa un enlazador de la fórmula general:



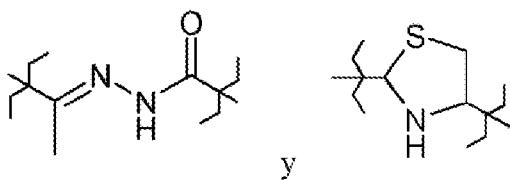
35 en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; Y representa un grupo CO o un grupo CH(OH); y Z representa un grupo de fórmula:

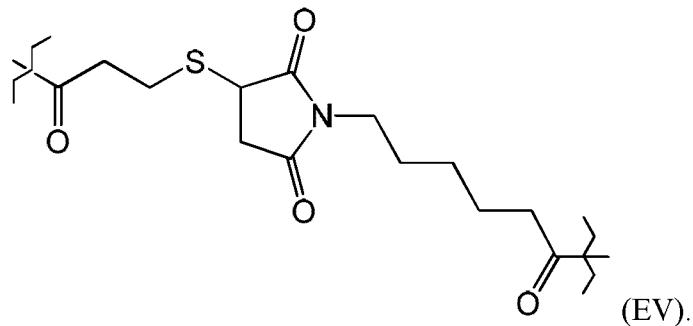


40 en la que cada uno de A y B representa un grupo alquíleno o alquenileno C₁₋₄; y
en la que L es un grupo saliente, por ejemplo uno de los que se describen a continuación.

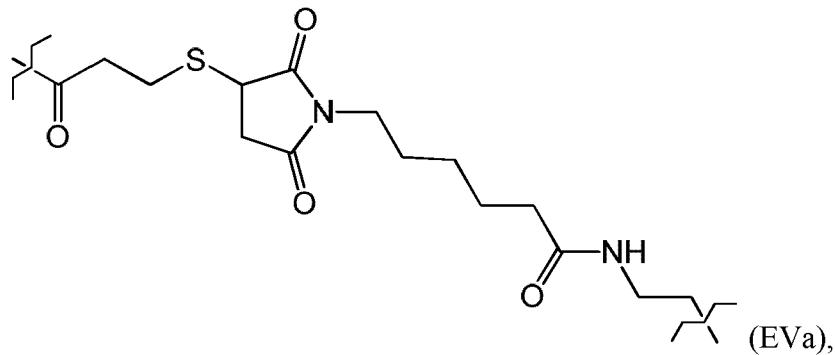
[0068] Puede utilizarse cualquier grupo enlazador Q o LK¹ adecuado. En una realización, Q o LK¹ puede ser, por ejemplo, un enlace directo, un grupo alquíleno (preferentemente un grupo alquíleno C₁₋₁₀), o un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, cualquiera de los cuales puede estar terminado o interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, grupos -NRⁿ (en los que Rⁿ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo

- (preferentemente alquilo C₁₋₆), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquilfenilo C₁₋₆)), grupos ceto, grupos -OCO-, grupos -COO-, -O-CO-O-, -O-CO-NR"-, -NR"COO-, -CONR"- y/o grupos -NR"CO-. Tales grupos arilo y heteroarilo Q forman una realización preferida de la invención. Los grupos arilo adecuados incluyen grupos fenilo y naftilo, mientras que los grupos heteroarilo adecuados incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina. Los grupos Q o Lk¹ enlazadores especialmente adecuados son grupos heteroarilo o, especialmente, arilo, especialmente grupos fenilo. Estos pueden tener un grupo enlazador con el agente terapéutico D, por ejemplo, un grupo que sea, o contenga, un grupo -NR"-CO- o -CO-NR"-, por ejemplo un grupo -NH-CO- o -CO-NH-.
- 5 [0069] Los sustituyentes que pueden estar presentes en un arilo opcionalmente sustituido, en especial un grupo fenilo o heteroarilo incluyen por ejemplo uno o más del mismo o de diferentes sustituyentes seleccionados entre alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₄, especialmente metilo, opcionalmente sustituido con OH o CO₂H), -CN, -NO₂, -CF₃, NR"₂, -CO₂R", -COH, -CH₂OH, -COR", -OR", -OCOR", -OCO₂R", -SR", -SOR", -SO₂R", -NR"COR", -NR".CO₂R", -NO, -NHOH, -NR".OH, -CH=N-NR".CO R", -N⁺R"₃, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, -C=CR" y -CH=CR"₂, en las que cada R" representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente alquilo C₁₋₆), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquilfenilo C₁₋₆). Se prefiere especialmente la presencia de sustituyentes electroatractantes. Los sustituyentes preferidos incluyen, por ejemplo, -CN, -CF₃, -NO₂, -OR", -OCOR", -SR", -NR"COR", -NHOH y -NR"CO₂R".
- 10 [0070] En otra realización, un enlazador Lk, Q o Lk¹, o cualquier otro enlazador, en un conjugado de acuerdo con la invención, puede contener un grupo degradable, es decir, puede contener un grupo que se degrada en condiciones fisiológicas, separando la carga útil del anticuerpo o de una porción de unión a antígeno del mismo al que esté unido. Como alternativa, puede ser un enlazador que no sea escindible en condiciones fisiológicas.
- 15 [0071] Los enlazadores degradables adecuados se analizan con más detalle a continuación.
- [0072] Los significados de q, r, z, c y d determinan el número total de grupos D presentes. Este número puede ser, por ejemplo, de hasta 20, por ejemplo, de hasta 15, por ejemplo, de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4.
- 20 [0073] Los conjugados de la invención y los reactivos de conjugación adecuados para prepararlos contienen un enlazador que une el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo a la carga útil. Este enlazador puede ser no degradable o degradable en condiciones fisiológicas. Los conjugados comprenden ventajosamente un enlazador degradable que contiene un grupo que se degrada en condiciones fisiológicas, separando la carga útil del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno del mismo a la que está, o en última instancia estará, unida. Cuando un enlazador se degrada en condiciones fisiológicas, este es preferentemente escindible en condiciones intracelulares. Cuando la diana es intracelular, preferentemente el enlazador es sustancialmente insensible a las condiciones extracelulares (es decir de modo que no se prohíba el suministro a la diana intracelular de una dosis suficiente del agente terapéutico).
- 25 [0074] Cuando un enlazador, por ejemplo Q o Lk¹, contiene un grupo degradable, este es normalmente sensible a las condiciones hidrolíticas, por ejemplo, puede ser un grupo que se degrada a determinados valores de pH (por ejemplo, condiciones ácidas). Las condiciones hidrolíticas/fácidas se pueden encontrar, por ejemplo, en endosomas o lisosomas. Como ejemplos de grupos susceptibles a la hidrólisis en condiciones ácidas se incluyen hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas, amidas cis-acónicas, ortoésteres y cetales. Como ejemplos de grupos susceptibles a las condiciones hidrolíticas se incluyen:
- 30 Enlazadores
- 35 [0075] En una realización preferida, un enlazador, por ejemplo Q o Lk¹, es o incluye
- 40
- 45
- 50



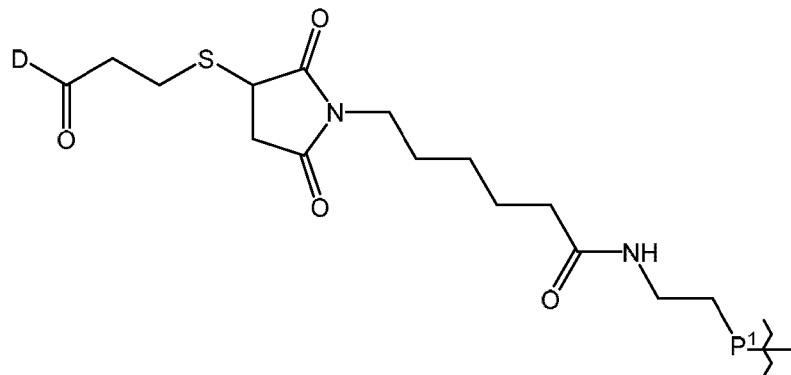


[0076] Por ejemplo, un enlazador, por ejemplo Q o Lk¹ puede ser:



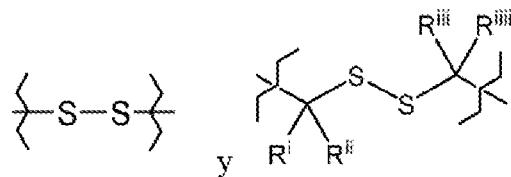
5

en cuyo caso este está preferentemente unido a grupos D y P¹ como se muestra:



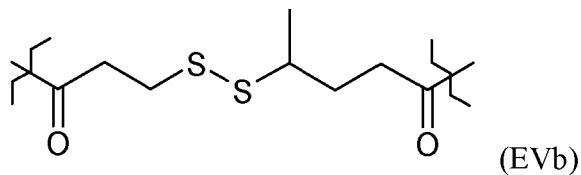
10

[0077] El enlazador también puede ser susceptible a degradación en condiciones reductoras. Por ejemplo, puede contener un grupo disulfuro que pueda escindirse al exponerse a agentes reductores biológicos, tales como tioles. Como ejemplos de grupos disulfuro se incluyen:

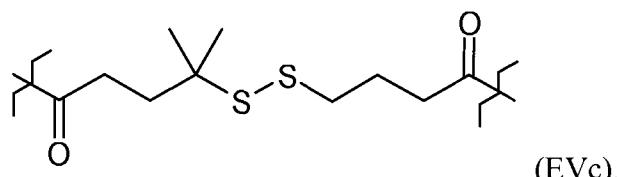


15

en el que R¹, R¹¹, R¹¹¹ y R¹¹¹¹ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄. En una realización preferida un enlazador, por ejemplo Q o Lk¹, es o incluye

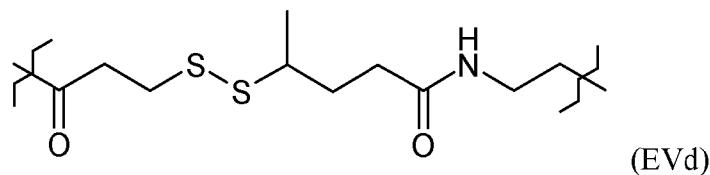


o



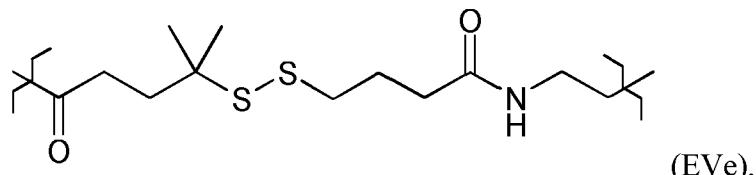
5

[0078] Por ejemplo, puede ser

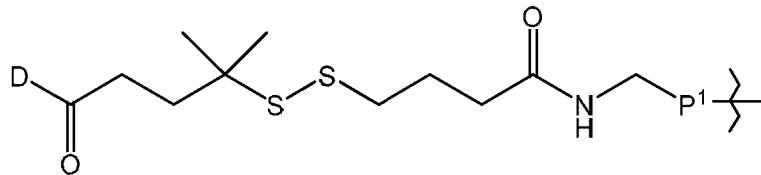
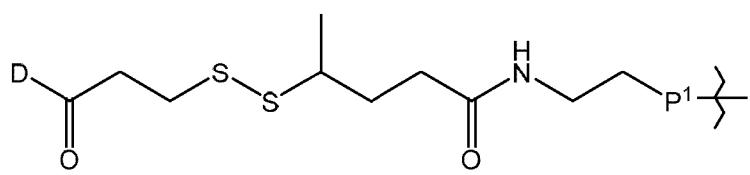


10

o



15 en cuyo caso el enlazador está preferentemente unido a grupos D y P¹ como se muestra:

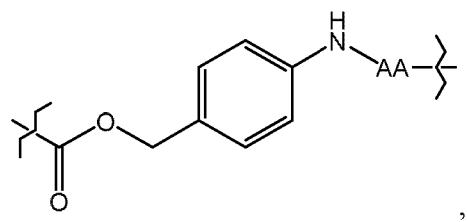


20

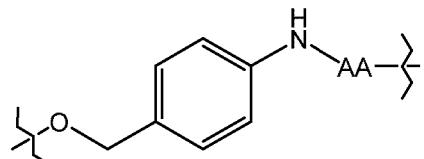
[0079] Un enlazador, por ejemplo Q o LK¹, también puede contener un grupo que sea susceptible a la degradación enzimática, por ejemplo puede ser susceptible a escisión por una proteasa (por ejemplo, una proteasa lisosómica o endosómica) o una peptidasa. Por ejemplo, puede contener un grupo peptídico que comprende al menos uno, por ejemplo, al menos dos, o al menos tres restos de aminoácidos (por ejemplo, Phe-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys). Por ejemplo, puede ser una cadena de aminoácidos que tenga de 1 a 5, por ejemplo de 2 a 4, aminoácidos.

25

[0080] Otro ejemplo de un grupo susceptible a la degradación enzimática es:



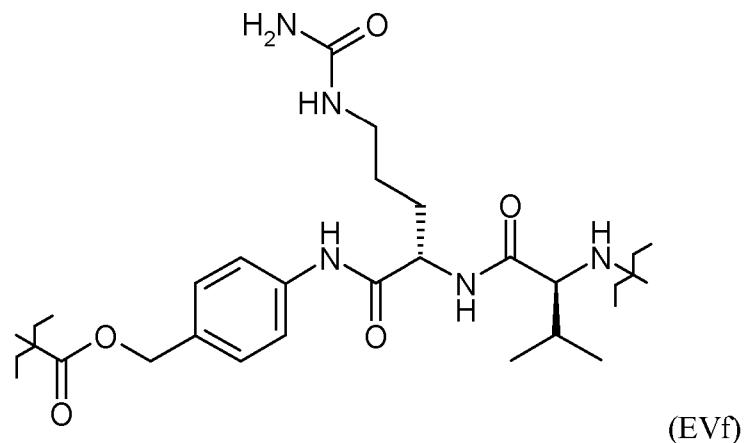
o



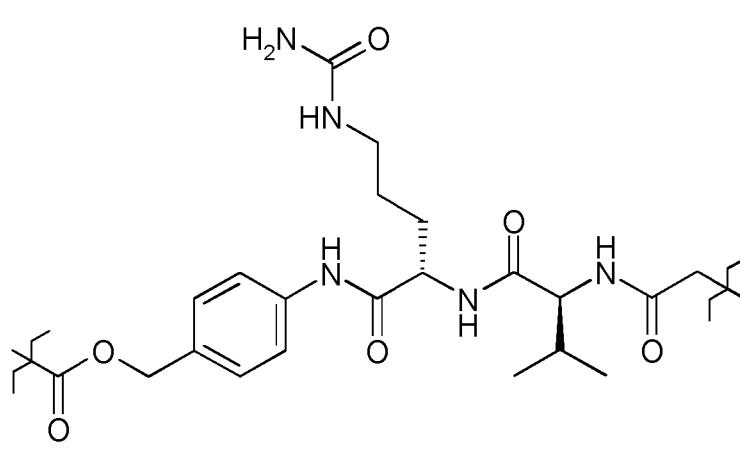
5

en donde AA representa una secuencia de aminoácidos, especialmente una que contiene 1 o dos restos de aminoácidos, especialmente una secuencia de aminoácidos específica de proteasa de dos restos, tal como Val-Cit.

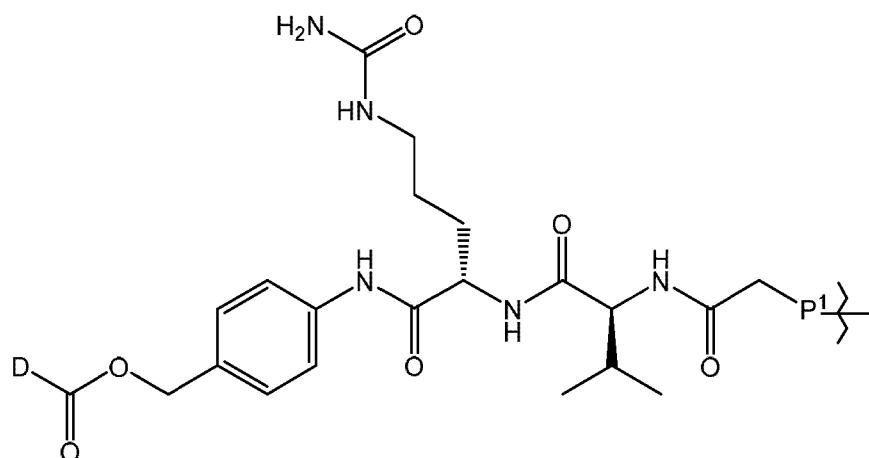
- 10 [0081] En una realización preferida, el enlazador, por ejemplo Q o Lk¹, es o incluye:



- [0082] Por ejemplo, puede ser

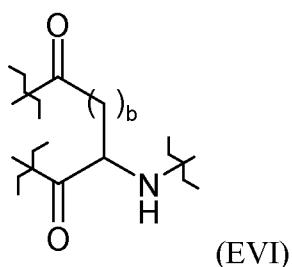


en cuyo caso este está preferentemente unido a grupos D de carga útil y P¹ como se muestra a continuación



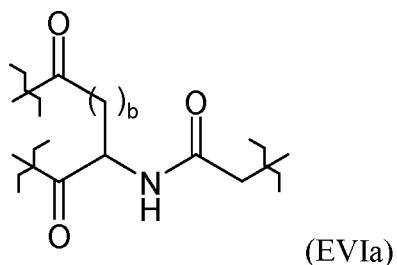
[0083] En una realización, un enlazador, por ejemplo Q o LK¹, lleva una única carga útil (es decir, q=1 en reactivos de conjugación de fórmula (II)). Los enlazadores específicos (EVa), (EVd) y (EVe) mostrados anteriormente son de este tipo. En otra realización, el enlazador lleva múltiples cargas útiles (es decir, q>1, por ejemplo, 2, 3 o 4, en los reactivos de conjugación de fórmula (II)) y el enlazador se utiliza como un medio de incorporación de más de una copia del agente terapéutico en un conjugado de la invención. En una realización, esto puede lograrse utilizando un enlazador LK¹ y/o LK² ramificado, el cual puede incorporar, por ejemplo, un resto de aspartato o glutamato o similar. Esto introduce un elemento de ramificación de fórmula:

10



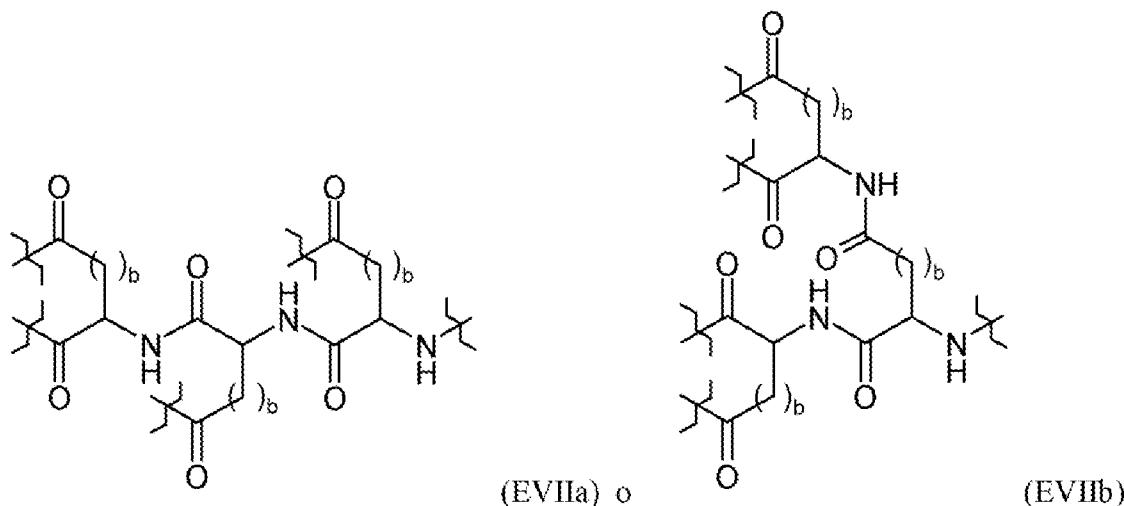
donde b es 1, 2 o 3, b = 1 es aspartato y b = 2 es glutamato, y b = 3 representa una realización preferida. Cada uno de los residuos acilo en la fórmula EVI puede acoplarse a una carga útil a través de un enlazador LK^{1a} adecuado, donde LK^{1a} es cualquier enlazador adecuado, por ejemplo un enlazador degradable que incorpora uno de los enlaces mencionados anteriormente. En realizaciones particulares, LK^{1a} representa el grupo (EVa), (EVd) o (EVe) como se muestra anteriormente. El grupo amino del resto de aspartato o glutamato o similar puede estar unido a P¹ por cualquier medio adecuado, por ejemplo, el enlace puede realizarse a través de un enlace amida, por ejemplo, el grupo de ramificación anterior puede estar conectado a P¹ a través de un grupo -CO-CH₂-, por tanto:

20



[0084] Si se desea, el resto de aspartato o glutamato o similar se puede acoplar a restos adicionales de aspartato y/o glutamato y/o similares, por ejemplo:

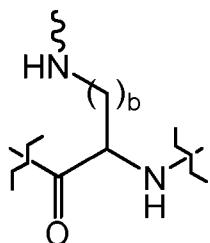
25



etc, dando la posibilidad de incorporar muchas unidades del agente terapéutico. Como se ha indicado anteriormente, cada unidad de carga útil puede unirse a un resto de aspartato/glutamato o similar mediante cualquier enlazador Lk^{1a}.

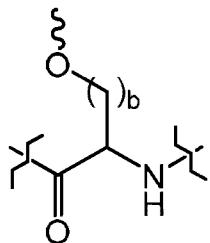
5

[0085] De manera similar, para formar un grupo ramificador, pueden introducirse los aminoácidos lisina, serina, treonina, cisteína, arginina o tirosina o restos similares, por tanto:



10

en la que b es 4 para lisina y



15 en la que b es 1 para serina.

Polímeros

[0086] Los conjugados de la presente invención pueden contener un oligómero o polímero (denominados conjuntamente en el presente documento "polímero" por comodidad), junto con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo puede conjugarse con un polímero mediante un enlazador. Como alternativa, el enlazador puede incluir en sí mismo un polímero, y éste puede conjugarse con el anticuerpo o con la porción de unión a antígeno del mismo. Un polímero es especialmente un polímero sintético, soluble en agua, en particular, polialquilenglicol. Un polímero puede ser, por ejemplo, un polialquilenglicol, una polivinilpirrolidona, un poliacrilato, por ejemplo, poliacriloil morfolina, un polimetacrilato, un polioxazolina, un alcohol polivinílico, una poliacrilamida o polimethacrilamida, por ejemplo policarboximatacrilamida o un copolímero HPMA. Adicionalmente, el polímero puede ser un polímero que sea susceptible de degradación enzimática o hidrolítica. Tales polímeros, por ejemplo, incluyen poliésteres, poliacetales, polí(ortho-ésteres), policarbonatos, polí(imino carbonatos) y poliamidas, tales como polí(aminoácidos). Un polímero puede ser un homopolímero, copolímero aleatorio o copolímero definido estructuralmente tal como un copolímero de bloque, por ejemplo, puede ser un copolímero de bloque procedente de dos o más óxidos de alquieno o de polí(óxido

de alquíleno) y o bien un poliéster, poliacetal, poli(orto éster) o un poli(aminoácido). Los polímeros polifuncionales que pueden usarse incluyen copolímeros de divinilester-anhídrido maleico y estireno-anhídrido maleico.

[0087] También se pueden usar polímeros de origen natural, por ejemplo polisacáridos tales como quitina, dextrano, 5 dextransa, quitosano, almidón, celulosa, glucógeno, polí(ácido sialílico), ácido hialurónico y derivados de los mismos. También se pueden usar polímeros tales como ácido poliglutámico, así como polímeros híbridos procedentes de monómeros naturales tales como sacáridos o aminoácidos y monómeros sintéticos tales como óxido de etileno o ácido metacrílico.

[0088] Si el polímero es un polialquilenglicol, este es preferentemente uno que contiene unidades C₂ y/o C₃ y es, 10 especialmente, un polietilenglicol. Un polímero, en particular un polialquilenglicol, puede contener una única cadena lineal o puede tener morfología ramificada compuesta por varias cadenas ya sean cortas o largas. Los denominados Pluronics son una clase importante de copolímeros de bloque de PEG. Estos proceden de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno. Pueden utilizarse, polialquilenglicos, sustituidos o protegidos, por ejemplo, 15 metoxipolietilenglicol.

[0089] El polímero puede ser, por ejemplo, un polímero en forma de peine producido mediante el método descrito 20 en el documento WO 2004/113394, cuyo contenido se incorpora como referencia en el presente documento. Por ejemplo, el polímero puede ser un polímero en forma de peine que tenga una fórmula general:



donde:

F, cuando está presente, puede obtenerse mediante polimerización por adición de uno o más monómeros olefínicamente insaturados que no son como se definen en G;
 G puede obtenerse mediante polimerización por adición de una pluralidad de monómeros lineales, ramificados o en forma de estrella, sustituidos o no sustituidos, y tienen un residuo olefínicamente insaturado;
 25 H, cuando está presente, puede obtenerse mediante polimerización por adición de uno o más monómeros olefínicamente insaturados que no son como se definen en G;
 f y h son un número entero entre 0 y 500;
 30 g es un número entero de 0 a 1000;

en donde al menos uno de F y G está presente.

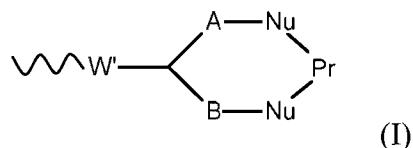
[0090] Opcionalmente, un polímero puede estar derivatizado o funcionalizado en cualquier modo que se deseé. Los 35 grupos reactivos se pueden unir en el extremo o grupo terminal del polímero, o a lo largo de la cadena del polímero a través de enlazadores colgantes; en tal caso, el polímero es, por ejemplo, una poliacrilamida, polimetacrilamida, poliacrilato, polimetacrilato, o un copolímero de anhídrido maleico. Si se desea, el polímero puede acoplarse a un soporte sólido usando métodos convencionales.

[0091] El peso molecular óptimo del polímero dependerá, por supuesto, de la aplicación prevista. Pueden utilizarse 45 polímeros de cadena larga, por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede ser de hasta aproximadamente 75.000, por ejemplo, de hasta 50.000, 40.000 o 30.000 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede estar en el intervalo de 500 g/mol a aproximadamente 75.000 g/mol. Sin embargo, oligómeros muy pequeños, 50 que consisten en cadenas distintas de PEG, por ejemplo, de tan solo 2 unidades de repetición, por ejemplo, de 2 a 50 unidades de repetición, son útiles para algunas aplicaciones y están presentes en una realización preferida de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un polímero que contenga de 2 a 48, por ejemplo, de 2 a 36, por ejemplo, de 2 a 24, unidades. Pueden utilizarse, por ejemplo, PEG de cadena lineal o ramificada con 12, 20, 24, 36, 40 o 48 unidades de repetición. Cuando se pretende que el conjugado salga de la circulación y entre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de inflamación causada por una enfermedad neoplásica, una infección o enfermedad autoinmunitaria, o por un traumatismo, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de menor peso molecular en el intervalo de hasta 30.000 g/mol. Para aplicaciones en las que se pretende que el conjugado permanezca en circulación, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo en el intervalo de 55 20.000 - 75.000 g/mol.

[0092] Preferentemente, el polímero es un polímero sintético y preferentemente es un polímero soluble en agua. El uso de un polietilenglicol soluble en agua es particularmente preferido para muchas aplicaciones.

[0093] Nuestra solicitud en trámite GB 1418986.4, a partir de la cual la PCT/GB2015/052953 reivindica prioridad, 60 publicada como WO2016/063006, se refiere al uso de enlazadores que contienen PEG de una estructura particular, y estos pueden utilizarse en la presente invención. Esa solicitud desvela lo siguiente:

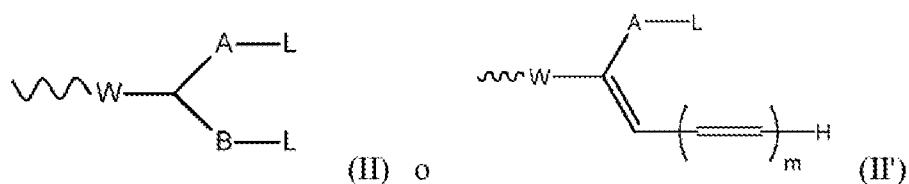
"La invención proporciona un conjugado de una proteína o péptido con un agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado, conteniendo dicho conjugado una porción de enlace a proteína o a péptido y una porción de polietilenglicol; en la que dicha porción de enlace a proteína o a péptido tiene la fórmula general:



5 en la que Pr representa dicha proteína o péptido, cada Nu representa un nucleófilo presente en la proteína o péptido, o unido a estos, cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alqueno o alquenileno C₁₋₄, y W' representa un grupo electroatrayente o un grupo obtenido por reducción de un grupo electroatrayente; y
10 en la que dicha porción de polietilenglicol es, o incluye, una cadena de polietilenglicol colgante que tiene un grupo extremo terminal de fórmula -CH₂CH₂OR en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₄, especialmente un grupo metilo o un grupo arilo opcionalmente sustituido, especialmente un grupo fenilo, especialmente un grupo fenilo no sustituido.

La invención también proporciona un reactivo de conjugación capaz de reaccionar con una proteína o péptido, e incluye un agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado y una porción de polietilenglicol; incluyendo dicho reactivo de conjugación un grupo de fórmula:

15

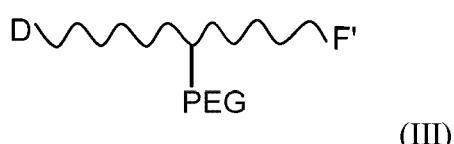


20 en la que W representa un grupo electroatrayente, A y B tienen los significados proporcionados anteriormente, m es de 0 a 4, y cada L representa independientemente un grupo saliente; y en la que dicha porción de polietilenglicol es, o incluye, una cadena de polietilenglicol colgante que tiene un grupo extremo terminal de fórmula -CH₂CH₂OR en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₄, especialmente un grupo metilo o un grupo arilo opcionalmente sustituido, especialmente un grupo fenilo, especialmente un grupo fenilo no sustituido.

25 La invención también proporciona un proceso para la preparación de un conjugado de acuerdo con la invención, que comprende hacer reaccionar una proteína o un péptido con un reactivo de conjugación de acuerdo con la invención.

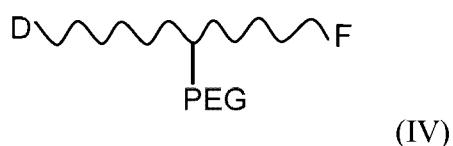
30

El conjugado de la invención puede representarse esquemáticamente mediante la fórmula:



35 en la que D representa el agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado, F' representa el grupo de fórmula I y PEG representa la cadena de polietilenglicol colgante que tiene un grupo extremo terminal de fórmula -CH₂CH₂OR.

El reactivo de la invención puede representarse esquemáticamente mediante la fórmula:



40 en la que D representa el agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado, F representa el grupo de fórmula II o II' y PEG representa la cadena de polietilenglicol colgante que tiene un grupo extremo terminal de fórmula -CH₂CH₂OR. Como se explica a continuación, la agrupación funcional F puede reaccionar con dos nucleófilos presentes en una proteína o péptido.

Una porción de polietilenglicol (PEG) de los conjugados y reactivos de la invención es, o incluye, una cadena de PEG colgante que tiene un grupo extremo terminal de fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$ en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₄, especialmente un grupo metilo o un grupo arilo opcionalmente sustituido, especialmente un grupo fenilo, especialmente un grupo fenilo no sustituido. Preferentemente, R es un grupo metilo o un átomo de hidrógeno.

El tamaño total de la porción de PEG dependerá, por supuesto, de la aplicación prevista. Para algunas aplicaciones, pueden utilizarse PEG de alto peso molecular, por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede ser de hasta aproximadamente 75.000, por ejemplo, de hasta 50.000, 40.000 o 30.000 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede estar en el intervalo de 500 g/mol a aproximadamente 75.000. Sin embargo, se pueden preferir porciones de PEG más pequeñas para algunas solicitudes.

En una realización preferida, todo el PEG de la porción de PEG está presente en la cadena de PEG colgante. En otra realización, el PEG también puede estar presente en la cadena principal de la molécula, y esto se comenta más adelante con mayor detalle.

Al igual que con la porción de PEG, el tamaño de la cadena de PEG colgante dependerá de la aplicación prevista. Para algunas aplicaciones, pueden utilizarse cadenas de PEG colgantes de alto peso molecular, por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede ser de hasta aproximadamente 75.000, por ejemplo, de hasta 50.000, 40.000 o 30.000 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular promedio en número puede estar en el intervalo de 500 g/mol a aproximadamente 75.000. Sin embargo, para muchas aplicaciones, se pueden usar cadenas de PEG colgantes más pequeñas. Por ejemplo dicha cadena de PEG puede tener un peso molecular de hasta 3.000 g/mol. Sin embargo, oligómeros muy pequeños, que consisten en cadenas distintas de PEG, por ejemplo, de tan solo 2 unidades de repetición, por ejemplo, de 2 a 50 unidades de repetición, son útiles para algunas aplicaciones y están presentes como dicha cadena de PEG en una realización preferida de la invención. La cadena de PEG colgante puede ser lineal o ramificada. Pueden utilizarse cadenas de PEG, por ejemplo, cadenas lineales o ramificadas con 12, 20, 24, 36, 40 o 48 unidades de repetición.

PROCESOS DE CONJUGACIÓN

[0094] Los reactivos de conjugación que contienen un grupo funcional capaz de reaccionar con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención pueden hacerse reaccionar con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno para formar un conjugado, y dicha reacción forma un aspecto adicional de la invención. En una realización preferida de este aspecto adicional de la invención, un reactivo de conjugación que tiene una de las estructuras Cl, Cl', CII o CIII descritas anteriormente (incluidas todas las subestructuras preferidas) se hace reaccionar con el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para formar un conjugado. El producto inmediato del proceso de conjugación utilizando uno de estos reactivos, es un conjugado que contiene un grupo W electroatrayente. Sin embargo, el proceso de conjugación es reversible en condiciones adecuadas. Esto puede ser deseable en algunas aplicaciones, por ejemplo, en caso de necesitar la liberación rápida de la carga útil, pero en otras aplicaciones, es posible que la liberación rápida de la carga útil no sea deseable. Por lo tanto, puede ser deseable estabilizar los conjugados reduciendo la fracción W electroatrayente para dar una fracción que impida la liberación de la carga útil. Por consiguiente, el proceso descrito anteriormente puede comprender una etapa opcional adicional de reducir el grupo W electroatrayente en el conjugado. El uso de un borohidruro, por ejemplo borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, borohidruro potásico o triacetoxiborohidruro sódico, como agente reductor, es particularmente preferido. Otros agentes reductores que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, cloruro de estaño (II), alcóxidos, tales como alcóxido de aluminio e hidruro de litio y aluminio.

[0095] Por tanto, por ejemplo, una fracción W que contiene un grupo ceto puede reducirse a una fracción que contenga un grupo CH(OH); se puede obtener un grupo éter por reacción de un grupo hidroxi con un agente eterificante; se puede obtener un grupo éster por reacción de un grupo hidroxi con un agente acilante; se puede preparar un grupo amina a partir de una cetona mediante aminación reductora; o se puede formar una amida mediante acilación de una amina. Una sulfona puede reducirse a un sulfóxido, sulfuro o éter tiol. Un grupo ciado puede reducirse a un grupo amina.

[0096] Una característica clave sobre el uso de los reactivos de conjugación de fórmula Cl o CII descritos anteriormente, es que un grupo saliente de α -metileno y un doble enlace, se conjugan de forma cruzada con una función electroatrayente que sirve como una fracción activadora de Michael. Si el grupo saliente es propenso a la eliminación en el reactivo interfuncional más que al desplazamiento directo y el grupo electroatrayente es una fracción activadora adecuada para la reacción de Michael, entonces puede producirse una bis-alquilación intramolecular secuencial mediante reacciones de Michael y retro Michael consecutivas. La fracción saliente sirve para enmascarar un doble enlace conjugado latente que no se expone hasta después de que se haya producido la primera alquilación para dar un reactivo de fórmula Cl' y la bis-alquilación es el resultado de reacciones secuenciales e interactivas de Michael y retro Michael. Los agentes alquilantes interfuncionales pueden contener enlaces múltiples conjugados con el doble enlace o entre el grupo saliente y el grupo electroatrayente.

[0097] Cuando el enlace al anticuerpo o a la porción de unión a antígeno del mismo se realiza a través de dos átomos

de azufre procedentes de un enlace disulfuro en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno, el proceso puede llevarse a cabo reduciendo el enlace disulfuro *in situ* después de lo cual el producto reducido reacciona con el reactivo de conjugación que tiene una de las estructuras C descritas anteriormente. Preferentemente el enlace disulfuro se reduce y cualquier exceso de agente reductor se elimina, por ejemplo, mediante intercambio de tampón, antes de introducir el reactivo de conjugación. El enlace de disulfuro puede reducirse, por ejemplo, con ditiotreitol, mercaptoetanol o tris-carboxietilfosfina usando métodos convencionales.

5 [0098] Las reacciones de conjugación pueden llevarse a cabo en condiciones similares a las de los procesos de conjugación conocidos, incluidas las condiciones desveladas en la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se utilizan 10 reactivos de conjugación que tienen una de las estructuras C descritas anteriormente, la reacción de conjugación de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en condiciones de reacción similares a las descritas en los documentos WO 2005/007197, WO 2009/047500, WO2010/100430, WO 2014/064423 y WO 2014/064424. El proceso puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un disolvente o mezcla de disolventes en la que todos los reactivos sean solubles.

15 Por ejemplo, se puede permitir que la proteína reaccione directamente con el reactivo de conjugación de polímero en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción también puede estar tamponado, dependiendo de los requisitos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción normalmente será de al menos 4,5, normalmente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5, preferentemente de aproximadamente 6,0 a 7,5. Las condiciones óptimas de reacción dependerán, por supuesto, de los reactivos específicos empleados.

20 [0099] Las temperaturas de reacción entre 3-40 °C son generalmente adecuadas cuando se usa un medio de reacción acuoso. Las reacciones realizadas en medios orgánicos (por ejemplo THF, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, DMF, DMSO) normalmente se realizan a temperaturas ambientales. En una realización preferida, la reacción se lleva a cabo en tampón acuoso que puede contener una proporción de disolvente orgánico, por ejemplo hasta el 20 % en volumen de disolvente orgánico, normalmente del 5 al 20 % en volumen de disolvente orgánico.

25 [0100] El anticuerpo o la porción de unión a antígeno puede conjugarse de manera eficaz usando un equivalente estequiométrico o un exceso ligero de reactivo de conjugación. Sin embargo, también es posible realizar la reacción de conjugación con un exceso de reactivo de conjugación, y esto puede ser deseable para algunas proteínas. El exceso de reactivo se puede eliminar fácilmente por medios convencionales, por ejemplo, intercambio iónico o 30 cromatografía HPLC, durante la posterior purificación del conjugado.

[0101] Por supuesto, es posible conjugar más de un reactivo de conjugación con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno, cuando el anticuerpo contiene suficientes puntos de unión adecuados. Por ejemplo, en un anticuerpo que contiene dos enlaces disulfuro diferentes o en un anticuerpo que contiene un enlace disulfuro y que también lleva una etiqueta de polihistidina, es posible conjugar dos moléculas del reactivo por molécula de anticuerpo. Los anticuerpos contienen generalmente 4 enlaces disulfuro adecuados y, mediante una elección adecuada de las condiciones de reacción, es posible conjugar un enlazador que lleve una carga útil a través de cada enlace disulfuro. Si cada enlazador lleva una única carga útil, esto da un conjugado con una relación de anticuerpo y fármaco (DAR) de 4. Como se ha descrito anteriormente, pueden unirse copias adicionales de la carga útil utilizando enlazadores ramificados.

40 [0102] Cuando el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un metal radiactivo o con un ion paramagnético, entonces, en algunas realizaciones, para unir estos iones, el metal radiactivo o el ion paramagnético puede reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga con uno o más grupos quelantes unidos a la cola larga. En algunas realizaciones, el reactivo puede llevar un grupo reactivo diseñado para unir de manera covalente el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo. Dicha cola larga puede ser un polímero tal como polilisina, un polisacárido, polietilenglicol (PEG) u otra cadena derivatizada o derivativizable que tenga grupos colgantes a los que se pueda unir un grupo quelante para unir los iones. Como ejemplos de grupos quelantes que pueden usarse de acuerdo con las realizaciones del presente documento se incluyen, aunque sin limitación, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), DOTA, NOTA, NODAGA, NETA, deferoxamina (Df, que también puede denominarse DFO), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares. Los mismos quelatos, cuando forman complejos con metales no radioactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para la RM (resonancia magnética), cuando se utilizan junto con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo y los transportadores descritos en el presente documento. Los quelatos macrocíclicos tales como NOTA, NODAGA, DOTA y TETA son de utilidad con diversos metales y 45 radiometales incluyendo, sin limitación, radionúclidos de galio, litio y cobre, respectivamente. Pueden utilizarse otros quelatos anulares, tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para unir radionúclidos de forma estable, tal como Radio-223 para inmunoterapia radiactiva (RAIT, *radioactive immunotherapy*). En determinadas realizaciones, 50 pueden utilizarse residuos quelantes para unir un agente de obtención de imágenes PET (*positron emission computed tomography*, tomografía computarizada de emisión positrónica), tal como un complejo de Aluminio-¹⁸F o Circonio-89, 55 radiometales incluyendo, sin limitación, radionúclidos de galio, litio y cobre, respectivamente. Pueden utilizarse otros quelatos anulares, tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para unir radionúclidos de forma estable, tal como Radio-223 para inmunoterapia radiactiva (RAIT, *radioactive immunotherapy*). En determinadas realizaciones, 60 pueden utilizarse residuos quelantes para unir un agente de obtención de imágenes PET (*positron emission computed tomography*, tomografía computarizada de emisión positrónica), tal como un complejo de Aluminio-¹⁸F o Circonio-89, con una molécula de direccionamiento, para su uso en análisis de PET.

UTILIDAD Y COMPOSICIONES

65 [0103] Los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención, y los conjugados de la invención, encuentran uso en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades y afecciones mediadas por PSMA o caracterizadas por una mayor expresión de PSMA. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo o

una porción de unión a antígeno del mismo de la invención o un conjugado de la invención, para su uso en diagnóstico o terapia, específicamente, para su uso en el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA. La invención también encuentra utilidad en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo o un conjugado de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección. En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo o de una porción de unión a antígeno del mismo o de un conjugado de acuerdo con la invención, para su uso en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA.

[0104] En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por PSMA es un cáncer, tal como cáncer de próstata o un cáncer que no es de próstata (incluidos los cánceres que no son de próstata descritos en cualquier otra parte del presente documento). Un cáncer que no es de próstata se selecciona preferentemente del grupo que consiste en cáncer de vejiga, incluido carcinoma de células de transición; cáncer de páncreas, incluido carcinoma del conducto pancreático; cáncer de pulmón, incluido carcinoma de pulmón no microcítico; cáncer de riñón, incluido carcinoma de células renales convencional; sarcoma, incluido sarcoma de tejido blando; cáncer de hígado, incluido adenocarcinoma metastásico; cáncer de mama, incluido carcinoma de mama; cáncer de cerebro, incluido glioblastoma multiforme; carcinoma neuroendocrino; cáncer de colon, incluido carcinoma colónico; cáncer testicular, incluido carcinoma embrionario testicular; y melanoma, incluido melanoma maligno. Los tratamientos más eficaces contra el cáncer requieren generalmente la administración conjunta de varios fármacos. Por tanto, se prefiere que el agente activo de la invención se administre junto con al menos un agente quimioterápico adicional.

[0105] En otro aspecto más, la presente invención encuentra utilidad en un método de uso de anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos o conjugados de la invención, para detectar *in vitro* o *in vivo* la presencia de antígeno PSMA en una muestra, p. ej., para diagnosticar una enfermedad relacionada con el PSMA (por ejemplo una enfermedad relacionada con el PSMA humano). En algunos métodos, esto se logra poniendo en contacto una muestra a analizar, junto con una muestra de control, con un anticuerpo de la invención o con una porción de unión a antígeno del mismo o con un conjugado de la invención (incluyendo una molécula biespecífica o multiespecífica), en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y el PSMA humano. Un ensayo de este tipo puede realizarse *in vitro*. La formación de complejos se detecta (p. ej., mediante ELISA) después en las muestras de prueba, y cualquier aumento estadísticamente significativo en la formación de complejos entre las muestras de prueba y las de control es indicativo de la presencia de PSMA en la muestra de prueba.

[0106] En otras realizaciones, la presente invención puede utilizarse en un método de diagnóstico de una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA, que comprende administrar a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo o un conjugado de la invención, conjugado con un agente de diagnóstico; exponer al sujeto a un método de obtención de imágenes para visualizar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo o el conjugado marcado, y determinar que el sujeto tiene una enfermedad o afección mediada por PSMA o caracterizada por una mayor expresión de PSMA.

[0107] Con fines de diagnóstico *in vivo*, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de la invención, está preferentemente en forma de un conjugado en el que el anticuerpo está marcado con un marcador detectable como ha descrito anteriormente. Los marcadores detectables incluyen marcadores radiactivos o fluorescentes. Los radiomarcadores que pueden utilizarse en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que se va a administrar incluyen, por ejemplo, actínio (²²⁵Ac), astato (²¹¹At), bismuto (²¹³Bi o ²¹²Bi), carbono (¹⁴C), cobalto (⁵⁷Co), cobre (⁶⁷Cu), flúor (¹⁸F), galio (⁶⁸Ga o ⁶⁷Ga), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In o ¹¹¹In), yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I o ¹²¹I), plomo (²¹²Pb), lutecio (¹⁷⁷Lu), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), platino (¹⁹⁵Pt), renio (¹⁸⁶Re o ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutenio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), tecnecio (⁹⁹Tc), iterbio (¹⁶⁹Yb o ¹⁷⁵Yb), o itrio (⁹⁰Y). En la técnica también se conocen bien cuales son los marcadores fluorescentes adecuados para su uso con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

[0108] Cuando se marca con un radionúclido apropiado (p. ej., el emisor de positrones Yodo-124, Cobre-64, Flúor-18, Galio-68 y/o Circonio-89 para imágenes PET) o con un fluoróforo (para la obtención de imágenes fluorescentes), el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo, puede utilizarse para obtención de imágenes preclínicas y/o clínicas de los pacientes. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo, también puede utilizarse como un posible agente de obtención de imágenes SPECT (*single-photon emission computed tomography*, tomografía computarizada de emisión monofotónica) simplemente cambiando el radiomarcador por radionúclidos de emisión monofotónica, tales como Indio-111, Yodo-123 y Lutitium-177.

[0109] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención, o un conjugado de acuerdo con la invención, junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. La composición también puede contener, si se desea, un principio activo adicional.

EJEMPLOS

- 5 [0110] A menos que se indique lo contrario, los reactivos disponibles en el comercio, a los que se hace referencia en los Ejemplos, se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fuente de células en los Ejemplos y a lo largo de la memoria descriptiva se identifica en cada caso con los números de registro ECACC o ATCC. ECACC (*European Collection of Cell Cultures*) es la Colección Europea de Cultivos Celulares, Salisbury, Inglaterra, mientras que ATCC (*American Type Culture Collection*) es la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, EE. UU. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. A continuación se describen métodos y materiales ilustrativos, aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención.
- 10
- 15 Lista de abreviaturas

[0111]

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
2TYAG	2x caldo TY que contiene ampicilina (100 µg/ml) y glucosa en el porcentaje especificado
2TYAK	2x caldo TY que contiene ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml)
CD40L	Ligando de CD40
CDR	Región determinante de complementariedad de un anticuerpo, numerada de 1 a 3 por región variable
CMV	Citomegalovirus
Ec _(0,1 %)	Absorbancia de una solución de proteína de 1 mg/ml.
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción enzimática
FW	Región marco de una región variable de anticuerpo
HBS-EP+	Solución salina tamponada con HEPES que contiene EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 % v/v
CI ₅₀	Concentración de anticuerpo de prueba que inhibe la unión competitiva al 50 %
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
k _a	Constante de velocidad de asociación
k _d	Constante de velocidad de disociación
K _D	Constante de disociación (k _d /k _a)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Pm	Peso molecular
DO _{280nm}	Densidad óptica medida a 280 nm
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBSM	Solución salina tamponada con fosfato con leche en polvo Marvel al 3 % p/v
PBST	Solución salina tamponada con fosfato con Tween-20 al 0,05 % v/v
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R _{máx}	Nivel de unión del analito en UR
UR	Unidades de resonancia
scFv	Fragmento variable monocatenario
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
S _m	Estequiometría de unión
TES	Tris HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, Sacarosa 0,5 M
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina
Región V	Región variable de una cadena de anticuerpo
VH	Región variable de cadena pesada
Vκ	Región variable de cadena ligera kappa

- 20 **Ejemplo 1:** Expresión y purificación de anticuerpos

[0112] Las variantes VH y Vκ y las secuencias comparadoras de anticuerpos de la técnica anterior se subclonaron en los vectores de expresión pANT, pANT17.2 y pANT13.2 para cadenas pesadas de IgG1 y para cadenas ligeras kappa (Km3), respectivamente (Figura 1). Las secuencias VH y Vκ se amplificaron por PCR utilizando cebadores que

introdujeron sitios de enzimas de restricción flanqueantes para la clonación. Las regiones VH se clonaron utilizando los sitios *Mlu*I y *Hind*III en marco con el gen de la cadena pesada $\gamma 1$ humana (alotipo G1m3 (G1m(f)), y las regiones V_k se clonaron usando los sitios de restricción *Bss*HII y *Bam*H I en marco con el gen de la región constante de la cadena ligera kappa humana (alotipo Km3). La transcripción de genes de cadena pesada y ligera estaba bajo el control del promotor I/E de CMV y el plásmido pANT17 contenía un minigen de *dhfr* mutante, bajo el control de un promotor de SV40, y la secuencia de poliA para la selección en células eucariotas. Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación. Tanto pANT17.2 como pANT13.2 contenían un gen de β -lactamasa (Ap^R) gen para la selección procariota y un origen de replicación pMB1 para la propagación en células procariotas. Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* XL1-blue (Stratagene).

[0113] Se seleccionaron cuatro secuencias de cadena pesada (designadas SEQ ID No 5, 7, 9 y 11) y tres de cadena ligera (designadas SEQ ID No 6, 8 y 10). Los ADN variantes de VH se combinaron con los ADN variantes de V_k . Estas combinaciones se transfecionaron transitoriamente en células adherentes HEK EBNA (ATCC®, CRL-10852™) usando un método de transfección PEI y se incubaron durante 5-7 días después de la transfección. Los sobrenadantes se utilizaron para el análisis de SPR de ciclo único o los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes de cultivos celulares en columnas de proteína A sefara (GE Healthcare), con tampón intercambiado en PBS pH 7,2 y cuantificado por DO_{280nm} utilizando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos predicha. Los anticuerpos que se prepararon se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1:

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera
AB-01* Progenitor/Molde	SEQ ID No 12	SEQ ID No 6
AB-02	SEQ ID No 5	SEQ ID No 6
AB-03*	SEQ ID No 7	SEQ ID No 8
AB-04*	SEQ ID No 9	SEQ ID No 8
AB-05*	SEQ ID No 5	SEQ ID No 10
AB-06*	SEQ ID No 11	SEQ ID No 10
AB-07*	SEQ ID No 12	SEQ ID No 10
AB-08*	SEQ ID No 13	SEQ ID No 14
AB-09*	SEQ ID No 15	SEQ ID No 16
J591 AB-10* desinmunizado	SEQ ID No 3	SEQ ID No 4

*anticuerpo que no está dentro del alcance de la invención reivindicada.

[0114] Los anticuerpos AB-08, AB-09 y AB-10 son anticuerpos de la técnica anterior. El anticuerpo murino J591 tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID No 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera SEQ ID No 2. Las secuencias se muestran alineadas entre sí en la Figura 5.

[0115] Las secuencias de ADN utilizadas para la expresión de las distintas cadenas de anticuerpos se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 2: Análisis de Anticuerpos mediante ELISA competitivo FACS (ejemplo no dentro del alcance de la invención reivindicada)

[0116] La unión de las variantes de J591 al antígeno PSMA se evaluó en un ELISA FACS competitivo frente al anticuerpo de referencia J591 desinmunizado (AB-10). El anticuerpo AB-10 se marcó con fluorescencia utilizando el kit de etiquetado de anticuerpos AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Paisley, RU). Se recogieron células NS0 que expresaban el PSMA (Clon 6/2F4, 3×10^5 células por tinción), se lavaron una vez con PBS de Dulbecco (PAA Laboratories, Yeovil, RU), se resuspendieron en tampón de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1 %/azida sódica al 0,05 %, suero de cabra al 2,5 %) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos humanizados de prueba a diversas concentraciones se premezclaron con una concentración constante de anticuerpo AB-10 marcado con Alexa-fluor 488 (concentración final de 0,5 μ g/ml). Después, las células bloqueadas se resuspendieron en 150 μ l/pocillo de las mezclas de anticuerpos prediluidas y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron 2x con PBS que contenía BSA al 1 %/azida sódica al 0,05 %, se transfirieron a tubos FACS y se analizaron en un instrumento FACScalibur, Becton Dickinson (Becton Dickinson, Oxford, RU), recogiendo 15000 acontecimientos por tubo. Los datos se analizaron trazando la intensidad de fluorescencia media geométrica frente a la concentración de anticuerpos de prueba. Como se muestra en la figura 2, AB-01 muestra un perfil de unión muy similar al del AB-10, con valores de CI50 de 0,46 y 0,42 ug/ml respectivamente.

Ejemplo 3: Medición de los anticuerpos madurados por afinidad mediante Biacore

[0117] Los experimentos cinéticos se realizaron en un Biacore T200, ejecutando el programa informático de

evaluación Biacore T200 V2.0.1. Todos los experimentos se ejecutaron a 25 °C con tampón de ejecución HBS-EP+ (solución salina tamponada con Hepes + EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 % (v/v), pH 7,4) (GE Healthcare).

[0118] Todos los experimentos cinéticos se realizaron utilizando como analito PSMA humano recombinante (R&D Systems). En todos los experimentos, los anticuerpos se inmovilizaron en una superficie de microplaca detectora con proteína A de la serie S (GE Healthcare). Para los experimentos cinéticos, la cantidad de ligando inmovilizado/capturado debe limitarse para impedir efectos de transferencia de masa en la superficie de la microplaca, e idealmente, la superficie debería tener un nivel de unión de analito ($R_{\text{máx}}$) de 50-150 UR. Utilizando un PM de 80 kDa para el analito PSMA, de 150 kDa para el ligando del anticuerpo (valor estimado para la IgG), 50 UR para el $R_{\text{máx}}$ y la estequiométría (S_m) como 2 debido a la capacidad de cada anticuerpo para unirse a 2 moléculas diana, se fijó un nivel de respuesta específico de 50 UR para la captura de todos los anticuerpos de muestra.

Análisis de ciclo único

[0119] Se realizó un análisis cinético de ciclo único en los sobrenadantes de células HEK EBNA transfectadas transitoriamente. Los anticuerpos se diluyeron en HBS-EP+ a una concentración de 0,5 µg/ml (según lo determinado mediante un ELISA cuantitativo de IgG). Al inicio de cada ciclo, los anticuerpos se cargaron en F_c2 , F_c3 y F_c4 de una microplaca de proteína A y las IgG se capturaron a un caudal de 10 µl/min para dar una UR de ~50. Después, se dejó que la superficie se estabilizara. Los datos cinéticos de ciclo único se obtuvieron a un caudal de 40 µl/min para minimizar cualquier efecto posible de transferencia de masa. Se realizaron múltiples repeticiones del anticuerpo AB-01 para comprobar la estabilidad de la superficie y del analito durante los ciclos cinéticos. La señal del canal de referencia F_e1 (sin anticuerpo) se restó de la del F_c2 , F_c3 y F_c4 para corregir diferencias en la unión no específica a una superficie de referencia. Se utilizó un intervalo de dilución con factor 2 de 3 puntos de PSMA de 12,5 a 50 nM sin regeneración entre cada concentración. La fase de asociación para las 3 inyecciones de concentraciones crecientes de PSMA se controló durante 200 segundos y se midió una única fase de disociación durante 300 segundos después de la última inyección de PSMA. La regeneración de la superficie de la proteína A se realizó utilizando 2 inyecciones de glicina-HCL 10 mM, pH 1,5, seguido de un período de estabilización de 400 segundos.

Análisis de ciclos múltiples

[0120] Para el análisis cinético de ciclos múltiples, el anticuerpo purificado se inmovilizó en HBS-EP+ a una concentración de proteína de 0,5 µg/ml. Al inicio de cada ciclo, el anticuerpo se capturó en proteína A para dar una UR de ~50 y se dejó que la superficie se estabilizara. Los datos cinéticos se obtuvieron a un caudal de 35 µl/min para minimizar cualquier efecto posible de transferencia de masa. Se programaron múltiples repeticiones del blanco (sin PSMA) y una repetición de una única concentración del analito en la ejecución cinética para comprobar la estabilidad tanto de la superficie como del analito a lo largo de los ciclos cinéticos. Para el análisis cinético, se seleccionó un intervalo de dilución de factor 2 de PSMA de 100 a 3,125 nM. La fase de asociación de PSMA se monitorizó durante 600 segundos y la fase de disociación se midió durante 1200 segundos. La regeneración de la superficie de la proteína A se realizó utilizando 2 inyecciones de glicina-HCL 10 mM, pH 1,5, al final de cada ciclo.

[0121] La señal del canal de referencia F_e1 se restó de la del F_c2 , F_c3 y F_c4 para corregir las diferencias en la unión no específica a una superficie de referencia, se utilizó un parámetro de $R_{\text{máx}}$ global en el modelo de unión 1 a 1. La K_D relativa en comparación con el mAb AB-01 se calculó dividiendo la K_D de las variantes entre la del mAb AB-01 en la misma microplaca.

Tabla 2a:

Nombre del anticuerpo	KD (M)	KD relativa
AB-01*	5,53 E-10	1,00
AB-02	2,80 E-10	1,98
AB-04*	3,54 E-10	1,56

Tabla 2b:

Nombre del anticuerpo	KD (M)	KD relativa
AB-01*	4,45 E-10	1,00
AB-03*	2,45 E-10	1,82

Tabla 2c:

Nombre del anticuerpo	KD (M)	KD relativa
AB-01*	4,13 E-10	1,00
AB-05*	2,24 E-10	1,84

Tabla 2d:

Nombre del anticuerpo	KD (M)	KD relativa
AB-01*	5,05 E-10	1,00
AB-06*	3,42 E-10	1,48

Tabla 2e:

Nombre del anticuerpo	KD (M)	KD relativa
AB-01*	4,69 E-10	1,00
AB-07*	3,58 E-10	1,31

*anticuerpo que no está dentro del alcance de la invención reivindicada.

5 [0122] Los datos mostrados en las Tablas 2a a 2e muestran que cada uno de estos anticuerpos posee mejor afinidad por el antígeno PSMA que el anticuerpo AB-01 analizado mediante análisis Biacore. Como el anticuerpo AB-01 tiene esencialmente la misma afinidad por el antígeno PSMA que el conocido anticuerpo J591 desinmunizado (en el presente documento AB-10, véase el Ejemplo 2 anterior), se observa que los anticuerpos de la presente invención tienen mejor afinidad por el antígeno PSMA que los anticuerpos J591 de la técnica anterior.

10 [0123] **Ejemplo 4:** Comparación de la estabilidad de los anticuerpos anti-PSMA mediante la prueba de estrés por calor Se incubaron muestras de anticuerpos (0,5 mg/ml en PBS) a 75 °C durante 30 minutos, seguido de una incubación en un baño con hielo durante 5 minutos antes de analizar su grado de agregación. El análisis de las soluciones de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) y con mediciones de turbidez.

15 SEC:

20 [0124] La SEC se realizó utilizando una columna de gel Super SW 3000 de TOSOH Bioscience TSK. Se controló la absorbancia de UV a 280 nm durante una elución isocrática con un tampón de fosfato de potasio 0,2 M, pH 6,8 (cloruro de potasio 0,2 M e isopropanol al 15 %). Los tiempos de elución y el número de picos indican si la muestra contiene anticuerpo agregado, degradado u originario. El % de área bajo la curva (Abs280) se utilizó para determinar la cantidad de cada especie presente en el análisis SEC.

25 **Resultados:**

[0125] Los resultados de los ensayos de estabilidad se muestran en la Tabla 3. A partir de este análisis, puede observarse que los anticuerpos de la técnica anterior AB-08, AB-09 y AB-10 son menos estables que los anticuerpos AB-02 a AB-06 de la presente invención.

30

Tabla 3:

Análisis de anticuerpos-prueba de estrés post.	Ab en conformación originaria (%)	Ab en forma agregada (%)
AB-02	10	90
AB-03*	36	64
AB-04*	27	73
AB-05*	2	98
AB-06*	2	98
J591 desinmunizado AB-10*	0,4	99,6
AB-08*	0	100
AB-09*	0	100

*anticuerpo que no está dentro del alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 5: Conjugación de anticuerpos anti-PSMA con el reactivo de maleimida mc-vc-PAB-MMAE para producir conjugados

35 [0126] Anticuerpos anti-PSMA, AB-02, AB-03*, AB-04*, AB-05*, AB-06*, AB-08* y AB-09* (*anticuerpo que no está dentro del alcance de la invención reivindicada), se conjugaron como se describe a continuación para producir los conjugados 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente.

40 [0127] Cada uno de los anticuerpos anti-PSMA a una concentración de 5,2 mg/ml en tampón de reacción (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, pH 7,5), se calentó a 40 °C durante 15 min. Se añadió TCEP (2 eq.) a

cada solución de mAb, se mezcló cuidadosamente y se incubó a 40 °C durante 1 h antes de dejarlo enfriar a 22 °C. El reactivo de maleimida, mc-val-cit-PAB-MMAE (Consortis Biosystems), se disolvió en DMF para dar una solución madre de 2,1 mM. Las soluciones de mAb reducidas se diluyeron a 4,2 mg/ml con tampón de reacción, se añadió mc-val-cit-PAB-MMAE (4 eq. por mAb) y la reacción se mezcló cuidadosamente y se incubó a 22 °C durante 1,5 h.

5 Finalmente las reacciones se trataron con *N*-acetil-L-cisteína 50 mM (20 eq. sobre reactivo) y se incubaron a 22 °C durante 1 h. Las mezclas de conjugación en bruto se analizaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Las reacciones en bruto se diafiltraron (Vivaspin 6, membrana de PES de 30 kDa) frente a DPBS, pH 7,1-7,5 para eliminar los reactivos y concentrar los conjugados. Las muestras concentradas se intercambiaron con tampón en DPBS, pH 7,1-7,5 mediante filtración en gel y después se filtraron con membranas esterilizadas (membranas de PVDF de 10 0,22 µm).

10 [0128] Los conjugados purificados se analizaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, *hydrophobic interaction chromatography*) utilizando una columna TOSOH TSK-gel Butil-NPR. Se analizó el área de cada pico obtenido para cada variante de la relación de anticuerpo y fármaco (DAR), (identificada por la relación de los máximos de absorbancia UV para el fármaco (248 nm) y el anticuerpo (280 nm) y el orden de elución de los picos). La DAR promedio se calculó tomando la suma del área integrada de cada variante de DAR multiplicada por la DAR y dividiendo este valor entre el área total integrada. Los valores de la DAR promedio obtenidos en cada conjugación fueron de 3,5 (\pm 0,2).

20 Ejemplo 6: Análisis de conjugados de anticuerpo y fármaco y carga útil libre mediante ensayo de viabilidad celular *in vitro*

25 [0129] Las eficacias *in vitro* de los CAF 1 a 7, preparados como se describe en el Ejemplo 4, se determinaron midiendo su efecto inhibidor sobre el crecimiento celular de líneas celulares de cáncer que sobreexpresan PSMA.

30 [0130] La pérdida de viabilidad de las células tumorales después del tratamiento *in vitro* con los fármacos citotóxicos o los CAF, puede medirse cultivando líneas celulares en presencia de concentraciones en aumento de fármacos o CAF y cuantificando la pérdida de proliferación o actividad metabólica usando el reactivo de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega). El protocolo describe la siembra de células, el tratamiento farmacológico y la determinación de la viabilidad celular en referencia a células no tratadas basándose en la síntesis de ATP, que está directamente relacionada con la cantidad de células presentes en el pocillo.

35 [0131] Las líneas de células tumorales LNCaP (CRL-1740) se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Se cultivaron células LNCaP y C4-2 en medio RPMI-1640 que contenía glutamina 2 mM (Life Technologies®), suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Las células se mantuvieron como se describe en las hojas de información del producto y siguiendo las recomendaciones generales de la ATCC de cultivo de tejidos. Las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC y las referencias citadas en esta, por ejemplo, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney 3^a edición, publicada por Alan R. Liss, N.Y. 1994, o 5^a edición publicada por Wiley-Liss, N.Y. 2005.

40 [0132] El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo®, como se describe en las instrucciones del fabricante, (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68:9280-9290). La luminiscencia se registró utilizando un lector de placas (por ejemplo, el lector de placas Spectramax M3 de Molecular Devices) y los datos se analizaron posteriormente utilizando un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros.

45 [0133] Si se representa en un gráfico, la viabilidad se expresó como % de células sin tratar y se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = 100 \times \frac{\text{Luminiscencia}_{\text{Muestra}} - \text{Luminiscencia}_{\text{Sin control celular}}}{\text{Luminiscencia}_{\text{Sin tratar}} - \text{Luminiscencia}_{\text{Sin control celular}}}$$

50 [0134] El % de viabilidad (eje Y) se representó frente al logaritmo de la concentración del fármaco en nM (eje X) para extrapolar los valores de CI50 de todos los conjugados así como de los fármacos libres. Las células LNCaP (clon FGC) y C4-2 positivas para PSMA se separaron con TrypLE y se resuspendieron en medio completo. Las células se contaron utilizando cámaras de recuento Neubauer desechables y la densidad celular se ajustó a 10×10^4 células/ml en el caso de LNCaP y a 2×10^4 células/ml en el caso de C4-2. Las células se sembraron (100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos blancos de paredes opacas tratadas con cultivo tisular (C4-2) o recubiertas con poli-D-lisina (LNCaP) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y con CO₂ al 5 % antes del ensayo.

60 [0135] Se prepararon diluciones en serie de ocho puntos de los CAF o fármaco libre por triplicado en el medio de cultivo relevante. Las líneas celulares se trataron con concentraciones de CAF de 50-0,00064 nM. Se usó MMAE a 500-0,0064 nM en células C4-2 y a 10.000-0,128 nM en células LNCaP. El medio de la placa que contenía las células adherentes se eliminó y se reemplazó por 100 µl/pocillo de los compuestos diluidos en serie. Después, las células se incubaron a 37 °C y con CO₂ al 5 % durante 96 h más.

[0136] Como se muestra en la tabla 4, en el intervalo de concentración probado, todos los CAF pudieron inhibir específicamente la proliferación de células LNCaP y C4-2 que expresaban el PSMA.

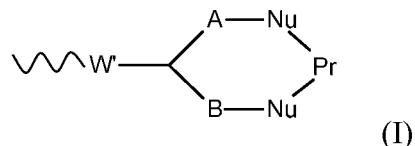
5 Tabla 4: Valores de IC₅₀ que muestran el efecto antiproliferativo de los CAF y la carga útil libre de MMAE en células LNCaP y C4-2.

CAF/Fármaco	LNCaP	C4-2
	IC50 (nM)	IC50 (nM)
1 AB-02-mc-val-cit-PAB-M MAE	0,61	0,18
2 AB-03-mc-val-cit-PAB-MMAE*	0,70	0,22
3 AB-04-mc-val-cit-PAB-MMAE*	0,67	0,21
4 AB-05-mc-val-cit-PAB-MMAE*	1,27	0,41
5 AB-06-mc-val-cit-PAB-MMAE*	0,78	0,26
6 AB-08-mc-val-cit-PAB-MMAE*	1,03	0,31
7 AB-09-mc-val-cit-PAB-MMAE*	0,89	0,24
MMAE*	2,23	0,63

*CAF/fármaco no dentro del alcance de la invención reivindicada.

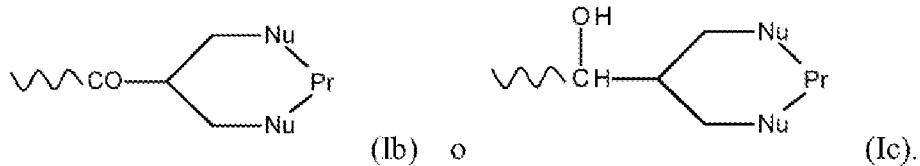
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une al PSMA y que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 6.
- 10 2. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.
- 15 4. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Un conjugado de anticuerpo que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 y una carga útil, por ejemplo, un agente terapéutico, de diagnóstico o etiquetado, y/o un polímero.
- 20 6. Un conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la carga útil está unida al anticuerpo o a la porción de unión a antígeno del mismo a través de una porción de enlace que tiene la fórmula general:



25 en la que Pr representa dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, cada Nu representa un nucleófilo presente en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo, o unido a estos, cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquíleno o alquenileno C₁₋₄, y W representa un grupo electroatrayente o un grupo obtenido por reducción de un grupo electroatrayente, por ejemplo un grupo ceto -CO-.

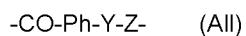
- 30 7. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la porción de enlace tiene la fórmula:



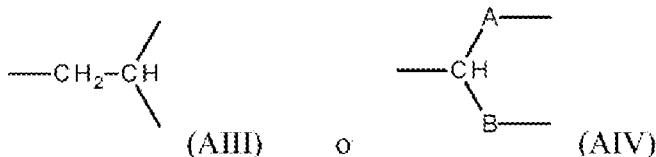
8. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene la fórmula general:



en la que D representa la carga útil;
 q representa un número entero de 1 a 10;
 Lk¹ representa un enlazador;
 40 r representa un número entero de 1 a 10;
 P¹ representa un enlace o un grupo c-valente -P²-NH- donde c es de 2 a 11 y P² es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH₂-CH₂- o unidad de etilenglicol -O-CH₂-CH₂-;
 p representa un número entero de 1 a 10;
 Lk² representa un enlace o un enlazador d-valente donde d es de 2 a 11 y que consta de 1 a 9 restos de aspartato y/o de glutamato;
 45 Lk³ representa un enlazador de la fórmula general:



- 50 en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; Y representa un grupo CO o un grupo CH.OH; y Z representa un grupo de fórmula:



en la que cada uno de A y B representa un grupo alquíleno o alquenileno C₁₋₄;

- 5 Ab representa un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con reivindicación 1, que se une a Lk³ a través de dos átomos de azufre procedentes de un enlace disulfuro en el anticuerpo o en la porción de unión a antígeno del mismo; y
 e representa un número entero de 1 a s, donde s es el número de enlaces disulfuro presentes en el anticuerpo o en la porción de unión al antígeno del mismo antes de conjugarse con Lk³.

- 10 9. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la carga útil es o incluye una auristatina o un maitansinoide.
10. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, que incluye un radioisótopo, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en Yodo-131, Itrio-90, Lutecio-177, Cobre-67, Astatina-211, Plomo-212/Bismuto-212, Actinio-225Bismuto-213 y Torio.
- 15 11. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que la carga útil es o incluye un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en al menos una de una sustancia radiactiva, un colorante, un agente de contraste, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, una enzima, un agente potenciador o una nanopartícula.
- 20 12. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, o un conjugado de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, para su uso en diagnóstico o terapia.
- 25 13. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, o un conjugado de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, para su uso en el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección mediada por PSMA o **caracterizada por** una mayor expresión de PSMA.
- 30 14. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, o un conjugado de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad mediada por PSMA es un cáncer, tal como cáncer de próstata, o un cáncer que no es de próstata, por ejemplo, un cáncer que no es de próstata seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, incluido carcinoma de células de transición; cáncer de páncreas, incluido carcinoma del conducto pancreático; cáncer de pulmón, incluido carcinoma de pulmón no microcítico; cáncer de riñón, incluido carcinoma de células renales convencional; sarcoma, incluido sarcoma de tejido blando; cáncer de hígado, incluido adenocarcinoma metastásico; cáncer de mama, incluido carcinoma de mama; cáncer de cerebro, incluido glioblastoma multiforme; carcinoma neuroendocrino; cáncer de colon, incluido carcinoma colónico; cáncer testicular, incluido carcinoma embrionario testicular; y melanoma, incluido melanoma maligno.
- 35 40 15. Un método para detectar la presencia de antígeno PSMA en una muestra usando el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, o un conjugado de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.

ES 2 983 492 T3

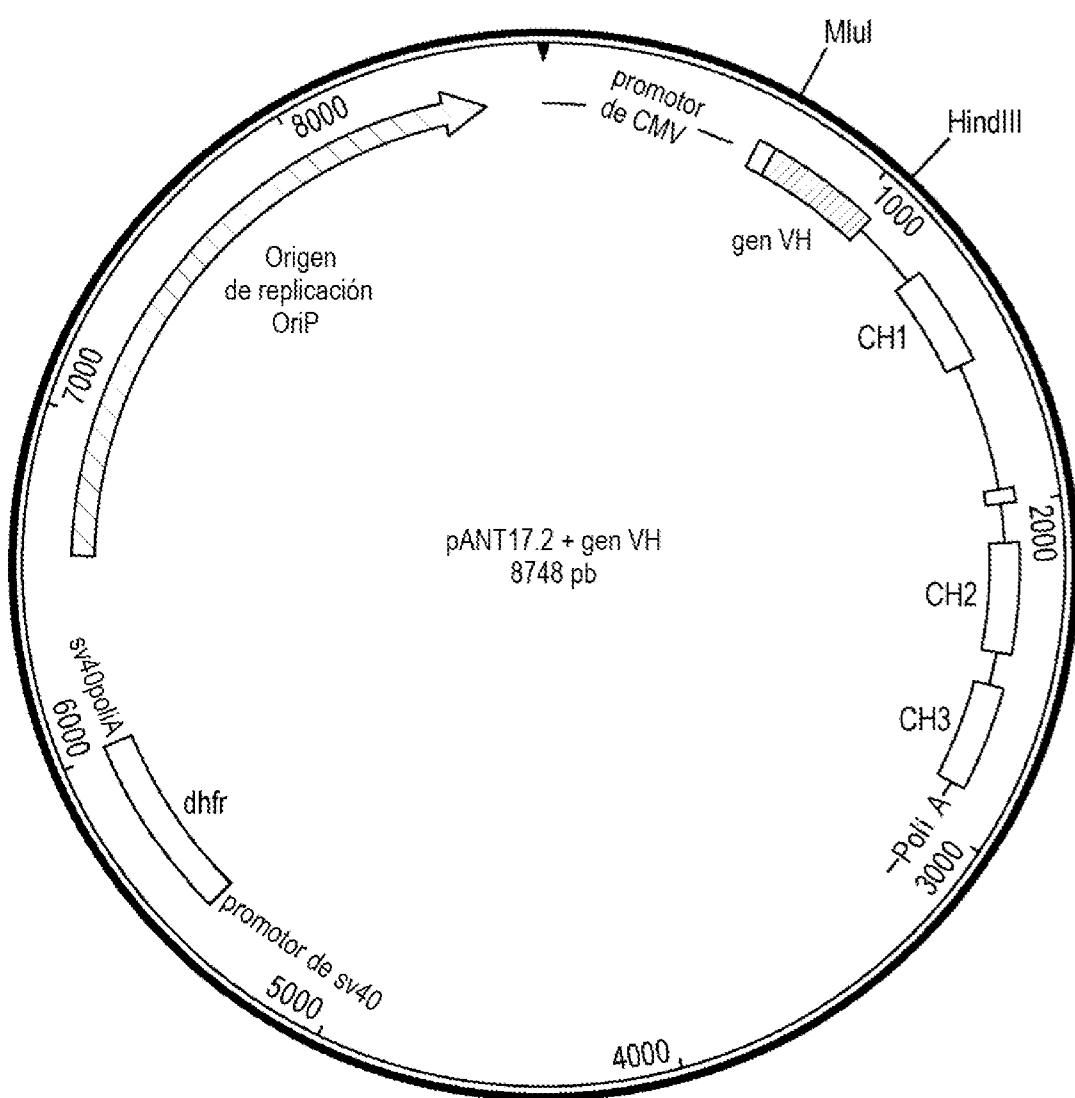


FIG. 1(a)

ES 2 983 492 T3

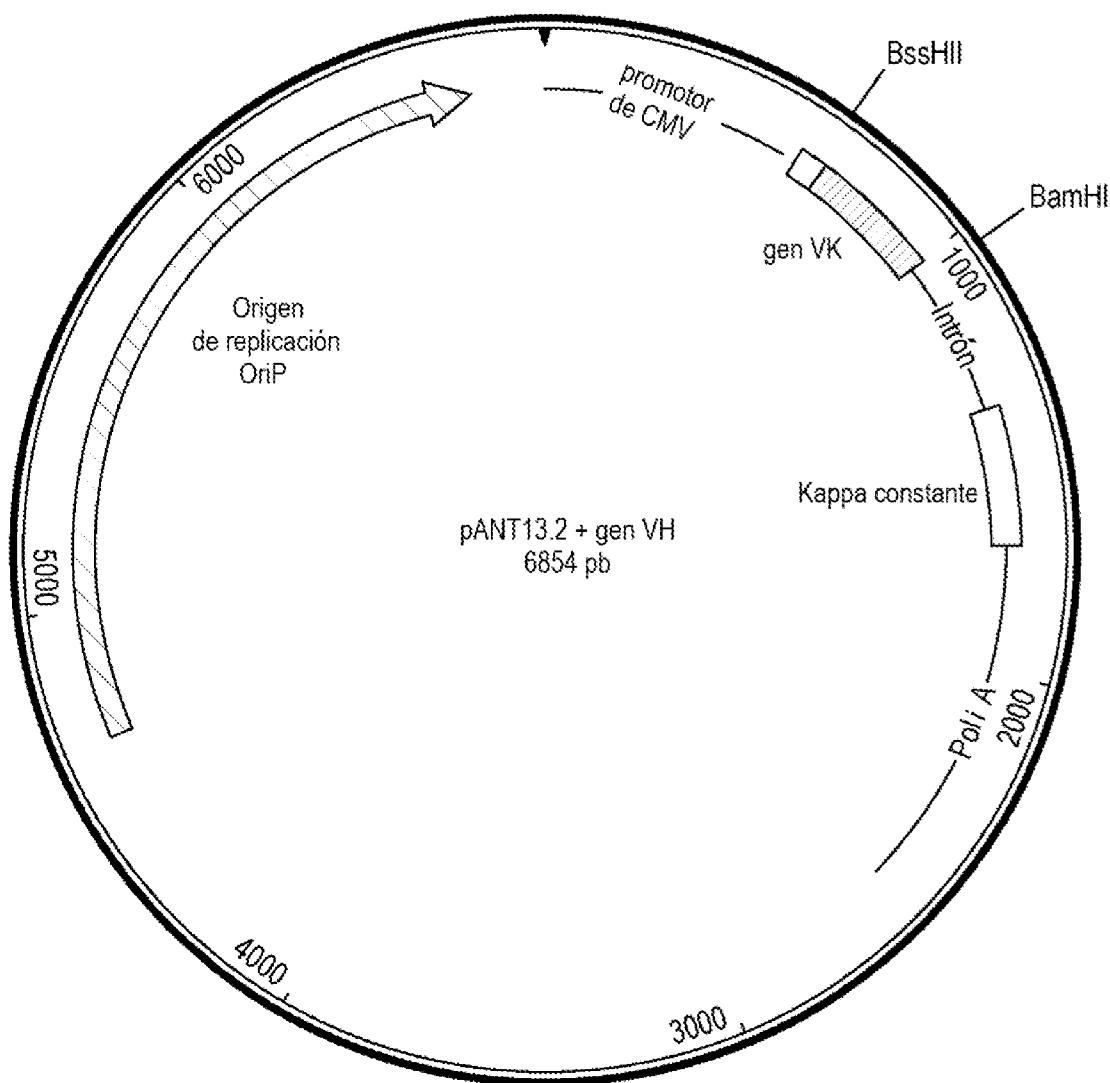


FIG. 1(b)

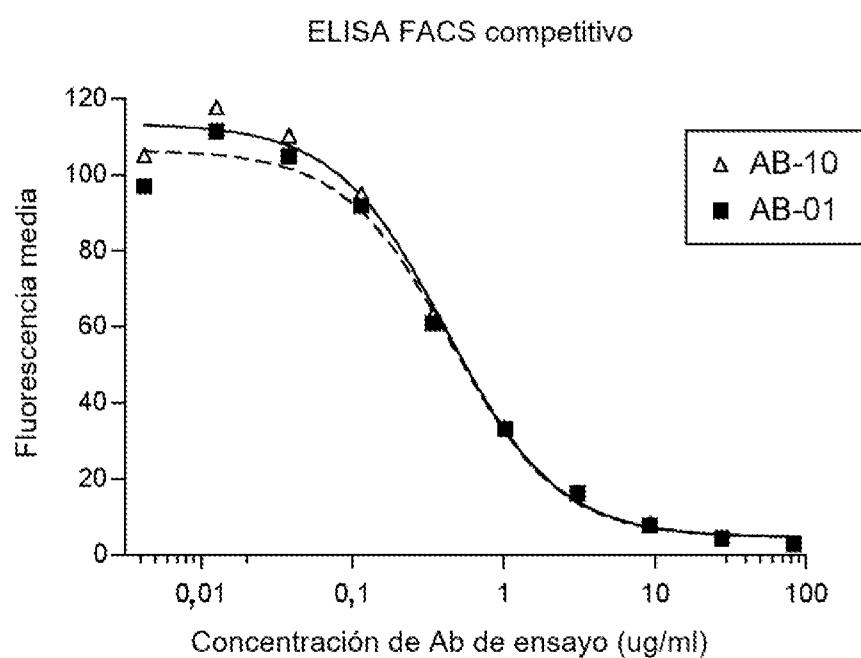


FIG. 2

Secuencias de aminoácidos

Aminoácidos de VH de J591 murino>Seq ID 1

EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGT
TYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGGTTLV
SS

Aminoácidos de VK de J591 murino>Seq ID 2

DIVMTQSHKFMSTSVDGRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

Aminoácidos de VH de J591 desinmunizado AB-10>Seq ID 3

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGG
TTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGTLLT
VSS

Aminoácidos de VK de J591 desinmunizado AB-10>Seq ID 4

DIQMTQSPSSLSTSVDGRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHT
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

Aminoácidos de VH de AB-02 y AB-05>Seq ID 5

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVT
VSS

Aminoácidos de VK de AB-01 y AB-02>Seq ID 6

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTTKVVDIK

FIG. 3

Aminoácidos de VH de AB-03>Seq ID 7

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGGWTFDYWGQGTTVT
VSS

Aminoácidos de VK de AB-03 y AB-04>Seq ID 8

DIQMTQSPTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQFTRYPLFGQGTKVDIK

Aminoácidos de VH de AB-04>Seq ID 9

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGAWTMDYWGQGTTV
TVSS

Aminoácidos de VK de AB-05, AB-06 y AB-07>Seq ID 10

DIQMTQSPTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQYNAYSLFGQGTKVDIK

Aminoácidos de VH de A6-03>Seq ID 11

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSPRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVT
VSS

Aminoácidos de VH de AB-01 y AB-07>Seq ID 12

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

FIG. 3 Continuación

Aminoácidos de VH de AB-08>Seq ID 13

MELGLRWGFL VALLRGVQCQ VQLVESGGV VQPGRSLRLS CAASGFAFSR
YGMHWVRQAP GKGLEWVAI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTQYL
QMNSLRAEDT AVYYCARGGD FLYYYYYGMD VWGQGTTVTV SS

Esta es la secuencia mostrada como SEQ ID NO 15 en el documento US 8.470.332 B

Aminoácidos de VK de AB-08>Seq ID 14

MRVPAQLLGL LLLWLPDTRC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS
NYLAWYQQKT GKVPKFLIYE ASTLQSGVPS RFSGGGSGTD FTLTISSLQP
EDVATYYCQN YNSAPFTFGP GTKVDIK.

Esta es la secuencia mostrada como SEQ ID NO 17 en el documento US 8.470.332 B

Aminoácidos de VH de AB-09>Seq ID 15

MELGLRWVLL VALLRGVQCQ VQLVESGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSN
YVMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AVYYCAGGYN WNYEYHYYGM DVWGQGTTVT VSS

Esta es la secuencia mostrada como SEQ ID NO 19 en el documento US 8.470.332 B

Aminoácidos de VK de AB-09>Seq ID 16

MRVPAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIT
NYLAWFQQKP GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FSLTISSLQP
EDFATYYCQQ YNSYPITFGQ GTRLEJK

Esta es la secuencia mostrada como SEQ ID NO 21 en el documento US 8.470.332 B

FIG. 3 Continuación

Secuencias de ADN

ADN de VH de J591 murino>Seq D 17

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGACTTCAGTG
AGGATATCCTGCAAGACTCTGGATAACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAAC
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAG
ACAAGTCCTCCAGCACGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATT
TGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGAACTTGAECTACTGGGGCCAAGGCACC
ACGCTCACCGTCTCCTCA

ADN de VK de J591 murino>Seq D 18

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCATCATCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT
CACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTGGCGCCGGGACCATGCTGGATCTCAAA

ADN de VH de J591 desinmunizado AB-10>Seq ID 19

GAGGTCCAACGGTACAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTG
AAGATATCCTGCAAGACTCTGGATAACACATTCACTGAATATACCATAACTGGG
TGAAGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGAAACATCAATCCTAAC
ATGGTGGTACCAACCTACAATCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACACTAACTGTAG
ACAAGTCCACCGATAACGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTAACAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTATTGTGCAGCTGGTTGAACTTGAECTACTGGGGCCAAGGGAC
CCTGCTCACCGTCTCCTCA

FIG. 4

ADN de V_K de J591 desinmunizado AB-10>Seq ID 20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCCACATCACTAGGAGACAGGG
TCACCCCTCACCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAAACCAGGACCATCTCCTAAACTACTGATTATTGGGCATCCACTCGGCAC
ACTGGAATCCCTAGTCGCTCTCAGGCAGTGGATCTGGACAGACTTCACTCTCA
CCATTCTAGTCTCAGCCTGAAGACTTGCAGATTATTACTGTCAGCAATATAAC
AGCTATCCTCTCACGTTGGTCCCTGGGACCAAGGTGGACATCAA

ADN de V_H de AB-02 y AB-05>Seq ID 21

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACAA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAACAGTTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTACTGGCTCTCGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

ADN de V_K de AB-01 y AB-02>Seq ID 22

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATCACTAGGAGACAGG
GTCACCACATCACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTATTACTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTGGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAA

FIG. 4 Continuación

ADN de VH de AB-03>Seq ID 23

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACAA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGGTGGTGGACCTCGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

ADN de VK de AB-03 y AB-04>Seq ID 24

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCACATCACTTGCAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT
CACCACAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTATTACTGTCAGCAGTTC
ACCAGGTATCCTCTCACGTTGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAA

ADN de VH de AB-04>Seq ID 25

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACAA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGGTGGCGTGGACCATGGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

FIG. 4 Continuación

ADN de VK de AB-05, AB-06 y AB-07>Seq ID 26

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTATTACTGTCAGCAATAT
AACCGTACTCGTTGACGTTGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAA

ADN de VH de AB-06>Seq ID 27

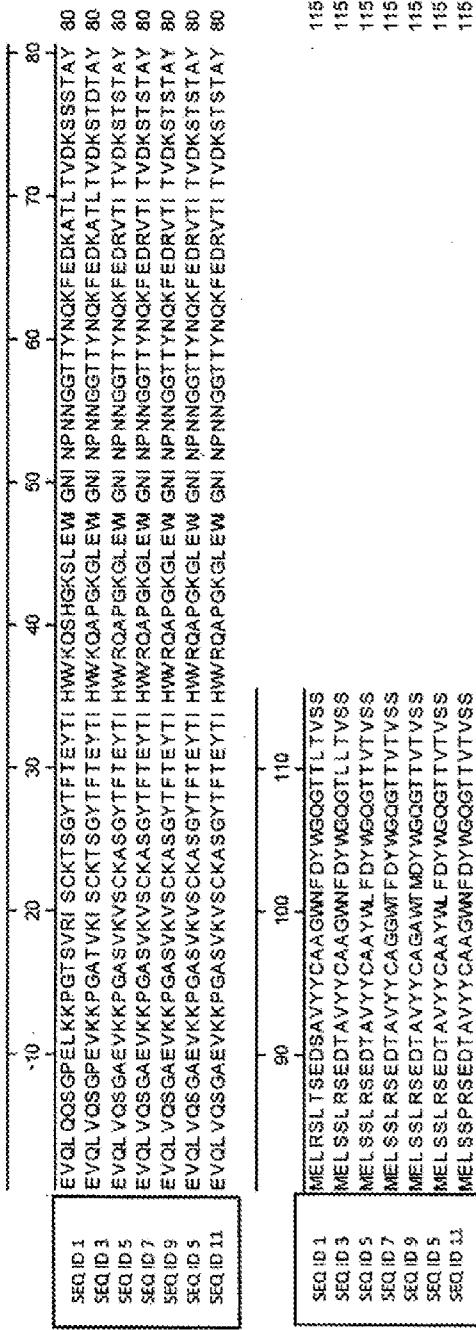
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAAC
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCCCGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

ADN de VH de AB-01 y AB-07>Seq ID 28

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAAC
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

FIG. 4 Continuación

Alineación de VH:



Alineación de VK:

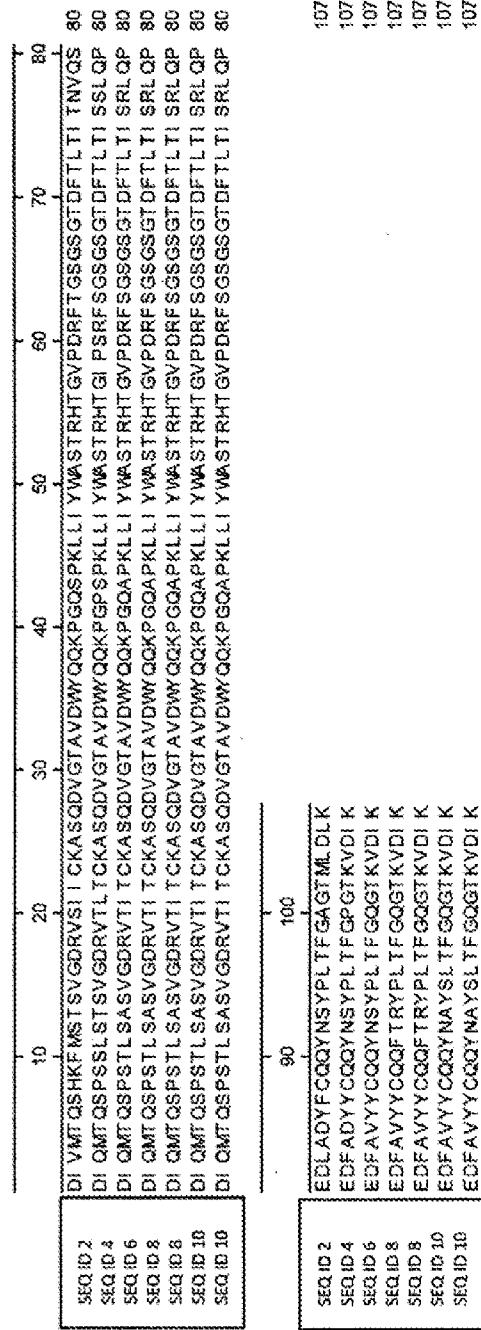


FIG. 5