

EI58841R/EX7779R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3773910

a nome di:

Ambrx, Inc.

“Coniugati farmaco-anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (PSMA) umanizzato”

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La descrizione dell'invenzione si riferisce a nuovi anticorpi per l'antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) e a coniugati farmaco-anticorpo. Più in particolare, la descrizione dell'invenzione si riferisce a metodi e a composizioni per l'uso di coniugati farmaco-anticorpo anti-PSMA nell'inibizione, prevenzione o trattamento di malattie o tumori correlati a PSMA.

FONDAMENTO DELL'INVENZIONE

Il cancro della prostata è la malignità non correlata alla pelle più comunemente diagnosticata in maschi nei paesi sviluppati. Si stima che un maschio su sei verrà diagnosticato con cancro della prostata. La diagnosi del cancro della prostata è migliorata dopo l'uso di marcatori basati sul siero come l'antigene prostatico-specifico (PSA). Inoltre, antigeni associati al tumore della prostata offrono bersagli per la formazione di immagini del tumore, la diagnosi e terapie mirate. L'antigene prostatico-specifico di membrana (PSMA), un marcatore associato a tumore della prostata, è un tale bersaglio. PSMA viene significativamente sovraespresso in cancro della prostata indipendente dagli androgeni. La sovraespressione di PSMA è associata con un alto grado del tumore, un alto rischio di progressione e recidiva della malattia (Perner et al, Human Pathology, 2007). Una alta espressione di PSMA è stata associata con prognosi clinica negativa e sopravvivenza significativamente più breve. L'espressione di PSMA viene osservata sia nel sito della malattia primario che in siti metastatici come ossa e nodi linfatici (Olson e Israel, Frontiers in Bioscience, 2014).

Sebbene negli anni siano state ricercate varie terapie mirate, quelle che comportano radioterapie sono avanzate maggiormente verso lo sviluppo clinico poiché hanno dimostrato sia efficacia che tollerabilità accettabile. Un altro sviluppo clinico di modalità che comportano somministrazione mirata di agenti citotossici non radioattivi ha avuto un successo limitato.

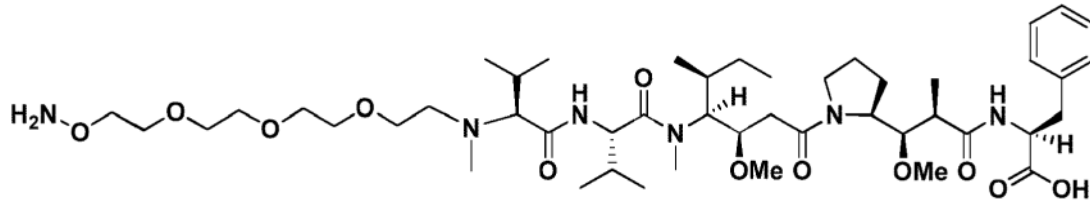
Date le proprietà fisiche di PSMA e il suo modello di espressione in relazione alla progressione del cancro della prostata, PSMA è un bersaglio eccellente nello sviluppo di coniugati farmaco-anticorpo. Coniugati farmaco-anticorpo (ADC) sono una classe potente di costrutti terapeutici che permettono la somministrazione mirata di

agenti citotossici a cellule bersaglio, come cellule cancerose. Per effetto della funzione di indirizzamento, questi composti dimostrano un indice terapeutico di molto superiore rispetto agli stessi agenti somministrati sistemicamente. ADC sono stati sviluppati come anticorpi intatti o frammenti di anticorpo, come scFv. L'anticorpo o frammento viene legato a una o più copie di farmaco tramite un legante che è stabile in condizioni fisiologiche, ma che può venire scisso quando all'interno della cellula bersaglio. Attualmente, solo un paio di ADC sono stati approvati per l'uso terapeutico, comprendenti gemtuzumab ozogamicina per AML (successivamente ritirato dal mercato), brentuximab vedotin per ALCL e linfoma di Hodgkin, e trastuzumab emtansina per cancro del seno metastatico HER2-positivo (Verma et al., N Engl J Med 367:1783-91, 2012; Bross et al., Clin Cancer Res 7:1490-96, 2001; Francisco et al., Blood 102:1458-65, 2003). Un certo numero di ADC che mirano vari agenti è in prove cliniche. Tuttavia, ADC che mirano PSMA affrontano sfide a causa della mancanza dell'indice terapeutico e della tossicità. WO 2017/212250 e WO 2018/033749 forniscono anticorpi coniugati umanizzati derivati da J591.

Quindi, esiste una necessità di prodotti terapeutici migliori o migliorati che mirano l'antigene PSMA e cancri correlati. Per superare questa carenza nella tecnica, la descrizione della presente invenzione fornisce in questa sede nuovi anticorpi anti-PSMA, varianti e composizioni di coniugati farmaco-anticorpo.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

In una realizzazione, la presente invenzione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo comprendente un anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anticorpo anti-PSMA) coniugato a un farmaco-legante, in cui la coniugazione avviene tramite una para-acetilfenilalanina incorporata nella sequenza della catena pesante, in cui l'anticorpo anti-PSMA comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 8 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9, in cui una para-acetilfenilalanina è incorporata nella posizione A114 della catena pesante secondo lo schema di numerazione di Kabat, e in cui il farmaco-legante è una monometilauristatina F non scindibile avente la struttura:



In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente un coniugato farmaco-anticorpo dell'invenzione e almeno un adiuvante, legante, tampone, veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica dell'invenzione, comprendente inoltre un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica dell'invenzione per l'uso in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica dell'invenzione e un agente terapeutico addizionale, per l'uso in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica dell'invenzione per l'uso con un agente terapeutico addizionale in un metodo di

riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce un agente terapeutico addizionale per l'uso con un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica dell'invenzione in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica, un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica e un agente terapeutico addizionale, un coniugato farmaco-anticorpo o una composizione farmaceutica; o un agente terapeutico addizionale per l'uso secondo la presente invenzione, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente ormonale, e in cui l'agente ormonale è enzalutammide.

SOMMARIO DELL'ULTERIORE DESCRIZIONE

La presente descrizione fornisce anticorpi anti-PSMA, varianti di anticorpo e composizioni di coniugato farmaco-anticorpo. In ulteriori aspetti, la descrizione fornisce coniugati farmaco-anticorpo (ADC) comprendenti tali anticorpi anti-PSMA.

La presente descrizione fornisce anticorpi anti-PSMA, varianti di anticorpo e una composizione di anticorpo comprendenti SEQ. ID. n.: 1 fino a 17. In alcuni aspetti, la descrizione fornisce coniugati farmaco-anticorpo (ADC) comprendenti SEQ. ID. n.: 1 fino a 17.

La presente descrizione fornisce anticorpi anti-PSMA, varianti di anticorpo e una composizione di anticorpo consistenti in SEQ. ID. n.: 1 fino a 17. In alcuni aspetti, la descrizione fornisce coniugati farmaco-anticorpo (ADC) consistenti in SEQ. ID. n.: 1 fino a 17.

La presente descrizione fornisce una variante di anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) comprendente una catena pesante e una catena leggera, in cui la sequenza della catena pesante viene scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16, e la sequenza della catena leggera viene scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17. In alcuni aspetti, la presente descrizione fornisce una variante di anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) comprendente una sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16. In alcuni aspetti, la presente descrizione fornisce una variante di anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) costituito da una sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17.

In altri aspetti, la presente descrizione fornisce una variante di anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) consistente in una sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16. In altri aspetti, la presente descrizione fornisce una variante di anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anti-PSMA) consistente in una sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17.

In un altro aspetto, la variante di anticorpo anti-PSMA comprende una catena leggera comprendente una regione a sequenza variabile scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 1 o 6. In ancora un altro aspetto, la variante di anticorpo anti-PSMA comprende una sequenza della catena leggera comprendente una regione variabile scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 2-5 o 7. In ancora un altro aspetto, la variante a catena pesante dell'anticorpo anti-PSMA consiste in una sequenza della regione variabile di SEQ. ID. n.: 1 o 6. In ancora un altro aspetto, la variante a catena leggera dell'anticorpo anti-PSMA consiste in una regione variabile scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 2-5 o 7.

In un ulteriore aspetto, la variante di anticorpo anti-PSMA comprende un amminoacido non naturale incorporato

nella sequenza della catena pesante o leggera dell'anticorpo. In un altro aspetto della presente descrizione, l'anticorpo comprende una variante di anticorpo anti-PSMA con uno o più amminoacidi codificati in modo non naturale sostituiti in una o più posizioni nella catena pesante o catena leggera dell'anticorpo. In alcuni aspetti, la catena pesante o la catena leggera nella variante di anticorpo per PSMA comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 amminoacidi codificati in modo non naturale. In altri aspetti, la sequenza della catena pesante o catena leggera nella variante di anticorpo per PSMA comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 amminoacidi codificati in modo non naturale in una o più posizioni nella catena pesante o catena leggera dell'anticorpo. In un aspetto, la sequenza della catena pesante dell'anticorpo anti-PSMA comprende un amminoacido codificato in modo non naturale. In un altro aspetto della presente descrizione, la variante di anticorpo anti-PSMA comprende una sequenza della catena pesante o leggera come presentata nella tabella 4.

In ulteriori aspetti della presente descrizione, l'anticorpo è una variante di anticorpo anti-PSMA comprendente la sequenza della catena leggera ottenuta da SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17 con un amminoacido codificato in modo non naturale sostituito in una posizione con elevata accessibilità superficiale e/o un sito che sarà di carica neutra per l'anticorpo. In ancora ulteriori aspetti della presente descrizione, l'anticorpo è una variante di anticorpo anti-PSMA comprendente la sequenza della catena pesante ottenuta da SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16 con un amminoacido codificato in modo non naturale sostituito in una posizione con elevata accessibilità superficiale e/o un sito che sarà di carica neutra per l'anticorpo.

In un aspetto, la presente descrizione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo anti-PSMA (ADC o un ADC anti-PSMA), in cui l'anticorpo è un anti-PSMA comprendente una sequenza della catena leggera e pesante. In ulteriori aspetti della presente descrizione, il ADC anti-PSMA comprende la catena leggera ottenuta da SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17 e la catena pesante ottenuta da SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16. In un aspetto della presente descrizione, il ADC anti-PSMA comprende uno o più amminoacidi codificati in modo non naturale sostituiti in una o più posizioni nella catena pesante o catena leggera dell'anticorpo.

In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un ADC anti-PSMA comprendente una catena pesante di SEQ. ID. n.: 8 e una leggera di SEQ. ID. n.: 9. In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un ADC anti-

PSMA comprendente SEQ. ID. n.: 12 e SEQ. ID. n.: 13. In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un ADC anti-PSMA comprendente SEQ. ID. n.: 14 e SEQ. ID. n.: 15. In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un ADC anti-PSMA comprendente SEQ. ID. n.: 16 e SEQ. ID. n.: 17.

In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che si legano a un recettore di PSMA. In altri aspetti della presente descrizione, l'anticorpo, la variante o la composizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che si legano alla superficie extracellulare del recettore di PSMA. In un altro aspetto della presente descrizione, l'anticorpo, la variante o la composizione descritti possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che si legano a un dimero di PSMA. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che hanno CDR ottenute da J591 innestate sulla regione strutturale della regione variabile. In altri aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che hanno un amminoacido codificato in modo non naturale. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che vengono descritti tramite più di uno degli aspetti altrove in questa sede nella presente descrizione. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante di anticorpo o la composizione(i) di anticorpo descritti in questa sede possono essere completamente umanizzati. In altri aspetti, l'anticorpo, la variante di anticorpo o la composizione(i) di anticorpo descritti in questa sede possono essere chimerici. In alcuni aspetti della presente descrizione, l'anticorpo può essere un anticorpo che è un anticorpo a lunghezza intera (regioni variabile + Fc), Fab, bispecifico, Fab-dimeri, Fab-bispecifico, Fab-trispecifico, attivatori di cellule T bispecifici, anticorpo di re-indirizzamento ad affinità duplice, anticorpo bispecifico IgG1/IgG3, diabody, diabody bispecifico, scFv-Fc, minibody.

In altri aspetti, l'anticorpo anti-PSMA, la variante di anticorpo o la composizione di anticorpo incorporano un amminoacido codificato non naturale comprendente un gruppo carbonile, un gruppo amminoossi, un gruppo idrazina, un gruppo idrazide, un gruppo semicarbazide, un gruppo azotidrato o un gruppo alchino. In un aspetto della descrizione, l'amminoacido codificato non naturale comprende un gruppo amminoossi. In ancora altri

aspetti, l'amminoacido codificato non naturale è para-acetilfenilalanina, p-nitrofenilalanina, p-solfotirosina, p-carbossifenilalanina, una o-nitrofenilalanina, una m-nitrofenilalanina, una p-boronilfenilalanina, una o-boronilfenilalanina, una m-boronilfenilalanina, una p-amminofenilalanina, una o-amminofenilalanina, una m-amminofenilalanina, una p-acilfenilalanina, una o-acilfenilalanina, una m-acilfenilalanina, una p-OMe fenilalanina, una o-OMe fenilalanina, una m-OMe fenilalanina, una p-solfofenilalanina, una o-solfofenilalanina, una m-solfofenilalanina, una 5-nitro His, una 3-nitro Tyr, una 2-nitro Tyr, una Leu sostituita con nitro, una His sostituita con nitro, un De sostituito con nitro, un Trp sostituito con nitro, un 2-nitro Trp, un 4-nitro Trp, un 5-nitro Trp, un 6-nitro Trp, un 7-nitro Trp, 3-amminotirosina, 2-amminotirosina, O-solfotirosina, 2-solfoossifenilalanina, 3-solfoossifenilalanina, o-carbossifenilalanina, m-carbossifenilalanina, p-acetil-L-fenilalanina, una p-propargil-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-allil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc β -serina, un L-Dopa, una fenilalanina fluorurata, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una p-iodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-ammino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina o una p-propargilossi-fenilalanina. In un altro aspetto della presente descrizione, l'amminoacido non naturale è para-acetilfenilalanina. In altri aspetti della presente descrizione, la variante di anticorpo anti-PSMA è un anticorpo monoclonale, un anticorpo umanizzato o un anticorpo chimerico. In un aspetto, la variante di anticorpo umanizzato anti-PSMA comprende una sequenza della catena pesante scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 8, 10, 12 o 14 e una sequenza della catena leggera scelta nel gruppo di SEQ. ID. n.: 9, 11, 13 o 15. In un altro aspetto, la variante di anticorpo chimerico anti-PSMA comprende una sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 16 e una sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 17.

In altri aspetti, la presente descrizione fornisce una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante di anticorpo anti-PSMA coniugata covalentemente a una tossina, un carico utile o un farmaco-legante. In un aspetto, la tossina, il carico utile o il farmaco-legante comprende un agente citotossico. In un aspetto, l'agente citotossico è una dolastatina, un derivato di dolastatina o un suo analogo. In altri aspetti, la

presente descrizione fornisce una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante di anticorpo anti-PSMA coniugata covalentemente a un farmaco-legante, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In altri aspetti, la presente descrizione fornisce una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante di anticorpo anti-PSMA di qualsiasi di SEQ. ID. n.: 1 fino a 17 coniugata covalentemente a una o più dolastatine, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un altro aspetto della presente descrizione, viene fornita una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante di anticorpo anti-PSMA di qualsiasi di SEQ. ID. n.: 8 fino a 17 coniugata covalentemente a una o più dolastatine, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un altro aspetto della presente descrizione, viene fornita una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante della sequenza della catena pesante di anticorpo anti-PSMA di SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16 coniugata covalentemente a una o più dolastatine, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un altro aspetto della presente descrizione, viene fornita una composizione di un coniugato farmaco-anticorpo comprendente una variante della catena leggera di anticorpo anti-PSMA di SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15 o 17 coniugata covalentemente a una o più dolastatine, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un altro aspetto, l'anticorpo è coniugato covalentemente ad almeno 2 dolastatine. In un aspetto, la composizione comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più derivati o analoghi di dolastatina. In un aspetto, la composizione comprende un derivato di dolastatina o è un analogo di dolastatina. In un altro aspetto, il derivato o analogo di dolastatina è una monometilauristatina, la monometilauristatina è monometilauristatina F (MMAF) o monometilauristatina E (MMAE). In altri aspetti, le una o più dolastatine sono MMAF non scindibile, MMAE non scindibile, MMAF scindibile, MMAE scindibile, MMAF scindibile corta o MMAE scindibile corta. In un ulteriore aspetto della descrizione, l'anticorpo è legato a un legante, un polimero o una molecola biologicamente attiva. In alcuni aspetti, il legante è polietilenglicole (PEG). In altri aspetti, il legante è un polietilenglicole ramificato o lineare. In ulteriori aspetti della presente descrizione, le varianti anti-PSMA possono essere

PEGilate. In ancora ulteriori aspetti della presente descrizione, le varianti anti-PSMA possono essere PEGilate sull'amminoacido codificato in modo non naturale. L'anticorpo anti-PSMA della presente descrizione può essere PEGilato con PEG da circa 5 kDa, PEG da circa 10 kDa, PEG da circa 20 kDa, PEG da circa 30 kDa, PEG da circa 40 kDa o superiore. La molecola di poli(etilenglicole) può avere un peso molecolare di fra circa 0,1 kDa e circa 100 kDa. La molecola di poli(etilenglicole) può avere un peso molecolare di fra 0,1 kDa e 50 kDa, 20 kDa e 40 kDa, e qualsiasi valore intero fra 25 kDa e 35 kDa. La molecola di poli(etilenglicole) può avere un peso molecolare di circa 30 kDa. La molecola di poli(etilenglicole) può essere una molecola lineare avente un peso molecolare di fra 0,1 kDa e 50 kDa, 20 kDa e 40 kDa, e qualsiasi valore intero fra 25 kDa e 35 kDa. La molecola di poli(etilenglicole) può essere una molecola lineare avente un peso molecolare di 30 kDa. La molecola di poli(etilenglicole) può avere un gruppo amminoossi in grado di reagire con un gruppo acetile su un amminoacido sintetico. La molecola di poli(etilenglicole) può essere un PEG lineare attivato da amminoossi da 30 kDa in grado di formare un legame ossima con la catena laterale di acetile di un amminoacido codificato in modo non naturale come, ma senza essere limitato a questa, para-acetilfenilalanina.

In un aspetto, la presente descrizione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo comprendente un anticorpo anti-PSMA umanizzato comprendente una sequenza della catena pesante scelta da SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16 e una sequenza della catena leggera scelta da SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15, coniugato ad almeno un farmaco-legante scelto dalle tabelle 1-3, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale incorporato nella sequenza della catena pesante. In alcuni aspetti, il farmaco-legante comprende un agente citotossico. L'agente citotossico è una dolastatina, un derivato di dolastatina o un suo analogo. In un aspetto, la dolastatina, derivato di dolastatina o analogo è una monometilauristatina scelta da monometilauristatina F (MMAF) o monometilauristatina E (MMAE). In un altro aspetto, la monometilauristatina è MMAE o MMAF scindibile, MMAE o MMAF non scindibile, MMAE o MMAF scindibile corta.

In un aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo per ridurre o inibire la crescita o la progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA, comprendente il portare in contatto il cancro o

la cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo. Il coniugato farmaco-anticorpo comprende un anticorpo anti-PSMA umanizzato comprendente una sequenza della catena pesante scelta da SEQ. ID. n.: 8, 10, 12, 14 o 16 e una sequenza della catena leggera scelta da SEQ. ID. n.: 9, 11, 13, 15, coniugato ad almeno un farmaco-legante scelto dalle tabelle 1-3, in cui la coniugazione si verifica tramite un amminoacido codificato in modo non naturale incorporato nella sequenza della catena pesante. In un altro aspetto, la descrizione fornisce un metodo comprendente inoltre il portare in contatto un cancro o una cellula cancerosa che esprime PSMA con una quantità efficace di un agente terapeutico. In un altro aspetto, l'agente terapeutico è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione. In un aspetto, l'agente ormonale è enzalutamide.

In altri aspetti, gli ADC anti-PSMA della descrizione possono venire somministrati con uno o più agenti immunostimolanti per indurre o potenziare una risposta immunitaria. Tali agenti immunostimolanti comprendono, ma senza essere limitati a questi, IL-2, oligonucleotidi immunostimolanti (per esempio motivi CpG), interferoni, fattore alfa di necrosi tumorale. In altri aspetti, gli ADC anti-PSMA della descrizione possono venire somministrati con uno o più immunomodulatori comprendenti, ma senza essere limitati a questi, citochine, chemiochine, adiuvanti o una loro combinazione.

In ulteriori aspetti, la presente descrizione fornisce un metodo di inibizione della crescita o progressione di un tumore in un soggetto, comprendente il fornire al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di un coniugato farmaco-anticorpo per PSMA della descrizione. In ancora un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo di trattamento di un soggetto avente cancro della prostata, comprendente il fornire al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione della descrizione.

In un aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo di trattamento di un soggetto avente una cellula cancerosa o un cancro che esprime PSMA comprendente: somministrare al soggetto una quantità efficace di un coniugato farmaco-anticorpo per trattare il cancro o la cellula cancerosa che esprime PSMA, in cui il coniugato farmaco-anticorpo comprende un anticorpo per PSMA comprendente una sequenza della catena pesante e della

catena leggera descritta in questa sede coniugata a un farmaco-legante tramite un amminoacido codificato in modo non naturale incorporato nell'anticorpo; e in cui il farmaco-legante viene scelto dalle tabelle 1-3. In un altro aspetto, un metodo di trattamento di un soggetto avente una malattia o un cancro correlato a PSMA comprende il fornire al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di coniugato farmaco-anticorpo anti-PSMA e un agente terapeutico. L'agente terapeutico è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione. L'agente terapeutico può venire fornito prima di, dopo o in congiunzione con un ADC anti-PSMA della descrizione.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce una composizione farmaceutica comprendente una variante di anticorpo anti-PSMA e almeno un adiuvante, legante, tampone, veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Una composizione farmaceutica comprende il coniugato farmaco-anticorpo della descrizione e almeno un adiuvante, legante, tampone, veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile. La composizione farmaceutica comprende inoltre un agente terapeutico. In un aspetto, la descrizione fornisce un medicinale per la produzione e per il trattamento di un cancro in un soggetto che ne necessita.

In un ulteriore aspetto, la presente descrizione fornisce un acido nucleico codificante qualsiasi di SEQ. ID. n.: 1-17. In un aspetto, la descrizione fornisce un vettore comprendente l'acido nucleico di SEQ. ID. n.: 1-17.

Si deve comprendere che i metodi e le composizioni descritti in questa sede non sono limitati alla metodologia, protocolli, linee cellulari, costrutti e reagenti particolari descritti in questa sede e, come tali, possono variare. Si deve anche comprendere che la terminologia usata in questa sede ha solamente lo scopo di descrivere aspetti particolari e non è destinata a limitare il campo dei metodi e delle composizioni descritto in questa sede, il quale sarà limitato solamente dalle rivendicazioni allegate.

Quando usate in questa sede e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un", "uno" e "il" comprendono i riferimenti plurali a meno che il contesto indichi chiaramente in modo diverso.

Se non altrimenti definiti, tutti i termini tecnici e scientifici usati in questa sede hanno lo stesso significato comunemente compreso da una persona di ordinaria esperienza nella tecnica alla quale appartengono le

invenzioni descritte in questa sede. Vari metodi, materiali e simili, simili o equivalenti a quelli descritti in questa sede, possono venire usati nella realizzazione pratica o nella valutazione delle invenzioni descritte in questa sede. In aspetti della presente descrizione vengono fornite nuove sequenze amminoacidiche anti-PSMA. Il termine “amminoacido” si riferisce ad amminoacidi presenti in natura e non naturali o innaturali, come pure analoghi di amminoacido e mimetici di amminoacido che agiscono in un modo simile agli amminoacidi presenti in natura. Gli amminoacidi codificati in modo naturale sono i 20 amminoacidi comuni (alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, cisteina, glutammina, acido glutammico, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina) e pirrolisina e selenocisteina. Analoghi di amminoacido si riferiscono a composti che presentano la stessa struttura chimica di base di un amminoacido presente in natura, solamente a titolo di esempio un α -carbonio che è legato a un idrogeno, un gruppo carbossile, un gruppo amminico e un gruppo R funzionale. Tali analoghi possono avere gruppi R modificati (a titolo di esempio norleucina) o possono avere catene principali peptidiche modificate pur mantenendo ancora la stessa struttura chimica di base come un amminoacido presente in natura. Esempi non limitativi di analoghi di amminoacido comprendono omoserina, norleucina, metioninsolfossido, metioninmetilsolfonio. Gli amminoacidi possono venire indicati in questa sede tramite il loro nome, i loro simboli a tre lettere o i loro simboli a una lettera comunemente noti raccomandati dalla IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Inoltre, i nucleotidi possono venire indicati tramite i loro codici a singola lettera comunemente accettati.

Un “gruppo di modifica del terminale amminico o carbossilico” si riferisce a qualsiasi molecola che può venire attaccata a, rispettivamente, un gruppo di ammina terminale o un gruppo carbossile terminale. A titolo di esempio, tali gruppi di ammina terminali o gruppi carbossile terminali possono essere all'estremità delle molecole polimeriche, in cui tali molecole polimeriche comprendono, ma senza essere limitate a questi, polipeptidi, polinucleotidi e polisaccaridi. Gruppi di modifica del terminale comprendono, ma senza essere limitati a questi, vari polimeri, peptidi o proteine solubili in acqua. Solamente a titolo di esempio, gruppi di modifica del terminale comprendono polietilenglicole o albumina del siero. Gruppi di modifica del terminale possono venire usati per modificare caratteristiche terapeutiche delle molecole polimeriche comprendenti, ma

senza essere limitate a questo, l'aumento della semi-vita nel siero di peptidi, polipeptidi o proteine.

In alcuni aspetti, la descrizione fornisce nuovi anticorpi e varianti di anticorpo anti-PSMA. Il termine "anticorpo" in questa sede si riferisce a una proteina consistente in uno o più polipeptidi codificati sostanzialmente da tutti o parte dei geni dell'anticorpo. I geni di immunoglobulina comprendono, ma senza essere limitati a questi, i geni della regione kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, epsilon e mu, come pure la miriade di geni della regione variabile di immunoglobulina. Anticorpo in questa sede intende anche includere anticorpi a lunghezza intera e frammenti di anticorpo, e include anticorpi che esistono naturalmente in qualsiasi organismo, varianti di anticorpo, anticorpi ingegnerizzati e frammenti di anticorpo. Anticorpo in questa sede intende anche includere un anticorpo intatto, anticorpi monoclonali o policlonali. Anticorpi in questa sede comprende anche anticorpi multispecifici e/o anticorpi bispecifici. Gli anticorpi della presente descrizione includono anticorpi umani. Gli anticorpi umani sono solitamente costituiti da due catene leggere e due catene pesanti, ciascuna comprendente regioni variabili e regioni costanti. La regione variabile della catena leggera comprende 3 CDR, identificate in questa sede come CDRL1, CDRL2 e CDRL3, affiancate da regioni strutturali. La regione variabile della catena pesante comprende 3 CDR, identificate in questa sede come CDRH1, CDRH2 e CDRH3, affiancate da regioni strutturali.

L'espressione "frammento di anticorpo" si riferisce in questa sede a qualsiasi forma di un anticorpo diversa dalla forma a lunghezza intera. Frammenti di anticorpo in questa sede includono anticorpi che sono componenti più piccoli che esistono entro anticorpi a lunghezza intera, e anticorpi che sono stati ingegnerizzati come varianti di anticorpo. Frammenti di anticorpo comprendono, ma senza essere limitati a questi, Fv, Fc, Fab e (Fab')₂, Fv a catena singola (scFv), diabody, triabody, tetrabody, anticorpi ibridi bifunzionali, CDR1, CDR2, CDR3, combinazioni di CDR, regioni variabili, regioni strutturali, regioni costanti, catene pesanti, catene leggere e regioni variabili, e molecole non di anticorpo con impalcatura alternativa, anticorpi bispecifici e simili (Maynard & Georgiou, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-76, 2000; Hudson, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:395-402, 1998). Un'altra sottostruttura funzionale è un Fv a catena singola (scFv), costituito dalle regioni variabili della catena pesante e leggera di immunoglobulina collegate covalentemente tramite un legante peptidico (Hu et al., *Cancer*

Research, 56, 3055-3061, 1996). Queste proteine piccole (Mr 25.000) mantengono generalmente la specificità e l'affinità per l'antigene in un singolo polipeptide e possono fornire un blocco costruttivo conveniente per molecole antigene-specifiche più grandi. Se non specificamente indicato altrimenti, dichiarazioni e rivendicazioni che usano il termine "anticorpo" o "anticorpi" comprendono specificamente "frammento di anticorpo" e "frammenti di anticorpo".

In realizzazioni della presente invenzione, vengono descritti nuovi coniugati farmaco-anticorpo (ADC) anti-PSMA. L'espressione "coniugato farmaco-anticorpo" o "ADC", quando usata in questa sede, si riferisce a una molecola di anticorpo, o suo frammento, che è legata covalentemente a una o più molecole biologicamente attive. La molecola biologicamente attiva può venire coniugata all'anticorpo tramite un legante, un polimero o altro legame covalente. Gli ADC sono una classe potente di costrutti terapeutici che consentono la somministrazione mirata di agenti citotossici a cellule bersaglio, come cellule cancerose. Per effetto della funzione di indirizzamento, questi composti dimostrano un indice terapeutico di molto superiore rispetto agli stessi agenti somministrati sistemicamente. Gli ADC sono stati sviluppati come anticorpi intatti o frammenti di anticorpo, come scFv. L'anticorpo o frammento è legato a una o più copie di farmaco tramite un legante che è stabile in condizioni fisiologiche, ma che può venire scisso quando all'interno della cellula bersaglio.

L'espressione "frammento legante l'antigene", quando usata in questa sede, si riferisce a uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi a un antigene. È stato dimostrato che la funzione di legame dell'antigene di un anticorpo può venire eseguita da frammenti di un anticorpo intatto. Esempi di frammenti leganti compresi entro l'espressione "frammento legante l'antigene" di un anticorpo comprendono (i) un frammento Fab, un frammento monovalente consistente nei domini V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) un frammento $F(ab')_2$, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab legati tramite un ponte disolfuro presso la regione cerniera; (iii) un frammento Fd consistente nei domini V_H e C_{H1} ; (iv) un frammento Fv consistente nei domini V_L e V_H di un singolo braccio di un anticorpo, (v) un frammento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), che consiste in un dominio V_H ; (vi) una regione determinante la complementarità (CDR) isolata, per esempio CDR3 della V_H comprendente o meno una sequenza addizionale (legante, regione(i) strutturale, ecc.), e (v) una

combinazione di due fino a sei CDR isolate comprendenti o meno una sequenza addizionale (legante, regione(i) strutturale, ecc.). Inoltre, sebbene i due domini del frammento F_V , V_L e V_H , vengano codificati mediante geni separati, essi possono venire uniti, usando metodi ricombinanti, tramite un legante sintetico che consente loro di venire prodotti come una singola catena polipeptidica in cui le regioni V_L e V_H si appaiano per formare molecole monovalenti (note come F_V a catena singola (scFv); vedere, per esempio, Bird et al., Science 242:423-426, 1988); e (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Tali anticorpi a catena singola sono anche destinati a venire compresi entro l'espressione "frammento legante l'antigene" di un anticorpo. Inoltre, i frammenti leganti l'antigene comprendono proteine di fusione di immunoglobulina con dominio di legame comprendente (i) un polipeptide del dominio di legame (come una regione variabile della catena pesante, una regione variabile della catena leggera o una regione variabile della catena pesante fusa a una regione variabile della catena leggera tramite un peptide legante) che è fuso a un polipeptide della regione cerniera di immunoglobulina, (ii) una regione costante CH2 della catena pesante di immunoglobulina fusa alla regione cerniera, e (iii) una regione costante CH3 della catena pesante di immunoglobulina fusa alla regione costante CH2. La regione cerniera può venire modificata sostituendo uno o più residui di cisteina con residui di serina per prevenire la dimerizzazione. Tali proteine di fusione di immunoglobulina con dominio di legame sono ulteriormente descritte in US 2003/0118592 e US 2003/0133939. Questi frammenti di anticorpo vengono ottenuti usando tecniche convenzionali note alle persone con esperienza nella tecnica, e i frammenti vengono selezionati per l'utilità nello stesso modo degli anticorpi intatti.

Un sito di legame per l'antigene tipico è costituito dalle regioni variabili formate tramite l'appaiamento di una immunoglobulina a catena leggera e una immunoglobulina a catena pesante. La struttura delle regioni variabili dell'anticorpo è molto coerente e presenta strutture molto simili. Queste regioni variabili sono tipicamente costituite da regioni strutturali (FR) relativamente omologhe, intervallate con tre regioni ipervariabili denominate regioni determinanti la complementarità (CDR). L'attività di legame globale del frammento di legame per l'antigene viene spesso dettata dalla sequenza delle CDR. Le FR svolgono spesso un ruolo nel posizionamento e allineamento in tre dimensioni appropriati delle CDR per il legame dell'antigene ottimale. In effetti, poiché le

sequenze delle CDR sono responsabili per la maggior parte delle interazioni anticorpo-antigene, è possibile esprimere anticorpi ricombinanti che mostrano le proprietà di anticorpi presenti in natura specifici costruendo vettori di espressione che includono sequenze delle CDR ottenute dall'anticorpo presente in natura specifico innestate su sequenze strutturali ottenute da un anticorpo diverso con proprietà diverse (vedere, per esempio, Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327, 1998; Jones, P. et al., Nature 321:522-525, 1986; e Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. USA 86:10029-10033, 1989). Tali sequenze strutturali possono venire ottenute da database di DNA pubblici che comprendono sequenze di geni di anticorpo della linea germinale. Queste sequenze della linea germinale differiranno da sequenze di geni di anticorpo maturo poiché non comprenderanno geni variabili completamente assemblati, che vengono formati mediante unione V(D)J durante la maturazione di cellule B. Sequenze di geni della linea germinale differiranno anche dalle sequenze di un anticorpo del repertorio secondario ad alta affinità che contiene mutazioni in tutto il gene variabile ma tipicamente raggruppate nelle CDR. Per esempio, mutazioni somatiche sono relativamente non frequenti nella porzione al terminale amminico della regione strutturale 1 e nella porzione al terminale carbossilico della regione strutturale 4. Inoltre, molte mutazioni somatiche non alterano significativamente le proprietà di legame dell'anticorpo. Per questa ragione, non è necessario ottenere l'intera sequenza del DNA di un particolare anticorpo per ricreare un anticorpo ricombinante intatto avente proprietà di legame simili a quelle dell'anticorpo originale. La sequenza parziale della catena pesante e leggera che copre le regioni CDR è tipicamente sufficiente per questo scopo. La sequenza parziale viene usata per determinare quali variabile della linea germinale e segmenti del gene di unione hanno contribuito ai geni variabili dell'anticorpo ricombinato. La sequenza della linea germinale viene quindi usata per riempire porzioni mancanti delle regioni variabili. Sequenze leader della catena pesante e leggera vengono scisse durante la maturazione della proteina e non contribuiscono alle proprietà dell'anticorpo finale. Per aggiungere sequenze mancanti, sequenze di cDNA clonate possono venire combinate con oligonucleotidi sintetici tramite ligazione o amplificazione mediante PCR. In alternativa, l'intera regione variabile può venire sintetizzata per creare un clone della regione variabile interamente sintetico. Questo procedimento presenta certi vantaggi come eliminazione o inclusione di particolari siti di restrizione, o ottimizzazione di particolari codoni. Naturalmente, la

totalità o porzioni della regione strutturale dell'anticorpo descritto in questa sede possono venire usate in congiunzione con le CDR per ottimizzare l'affinità, specificità o qualsiasi di altre proprietà desiderate dell'anticorpo.

In alcuni aspetti, la descrizione si riferisce a polimeri come un polimero bifunzionale. Un "polimero bifunzionale", anche indicato come un "legante bifunzionale", si riferisce a un polimero comprendente due gruppi funzionali che sono in grado di reagire specificamente con altre parti per formare legami covalenti o non covalenti. Tali parti possono comprendere, ma non sono limitate a questi, i gruppi laterali su amminoacidi naturali o non naturali o peptidi che contengono tali amminoacidi naturali o non naturali. Le altre parti che possono venire legate al legante bifunzionale o polimero bifunzionale possono essere parti uguali o diverse. Solamente a titolo di esempio, un legante bifunzionale può avere un gruppo funzionale reattivo con un gruppo su un primo peptide e un altro gruppo funzionale che è reattivo con un gruppo su un secondo peptide, formando così un coniugato che comprende il primo peptide, il legante bifunzionale e il secondo peptide. Molte procedure e molecole leganti per l'attacco di vari composti a peptidi sono note. Vedere, per esempio, la domanda di brevetto europeo n. 0188256; i brevetti U.S. n. 4.659.839; 4.414.148; 4.699.784; 4.680.338; e 4.569.789. Un "polimero multi-funzionale", anche indicato come un "legante multi-funzionale", si riferisce a un polimero comprendente due o più gruppi funzionali che sono in grado di reagire con altre parti. Tali parti possono comprendere, ma senza essere limitate a questi, i gruppi laterali su amminoacidi naturali o non naturali (comprendenti, ma senza essere limitati a questi, gruppi laterali di amminoacido), per formare legami covalenti o non covalenti. Un polimero bi-funzionale o un polimero multi-funzionale possono avere qualsiasi lunghezza o peso molecolare desiderati e possono venire scelti per fornire una particolare spaziatura o conformazione desiderata fra una o più molecole legate a un composto e molecole che esso lega, o al composto.

Il termine "biodisponibilità", quando usato in questa sede, si riferisce alla velocità e all'entità alle quali una sostanza o la sua parte attiva viene somministrata da una forma di dosaggio farmaceutica e diventa disponibile nel sito di azione o nella circolazione generale. Aumenti nella biodisponibilità si riferiscono all'aumento della velocità ed entità alle quali una sostanza o la sua parte attiva viene somministrata da una forma di dosaggio

farmaceutica e diventa disponibile nel sito di azione o nella circolazione generale. A titolo di esempio, un aumento nella biodisponibilità può venire indicato come un aumento nella concentrazione della sostanza o della sua parte attiva nel sangue quando confrontata con altre sostanze o parti attive.

L'espressione "molecola biologicamente attiva", "parte biologicamente attiva" o "agente biologicamente attivo", quando usata in questa sede, designa qualsiasi sostanza che può influenzare qualsiasi proprietà fisica o biochimica di un sistema biologico, percorso, molecola o interazione con riferimento a un organismo compresi, ma senza essere limitati a questi, virus, batteri, batteriofago, transposone, prione, insetti, funghi, piante, animali e uomini. In particolare, quando usata in questa sede, molecole biologicamente attive comprendono, ma senza essere limitate a queste, qualsiasi sostanza destinata alla diagnosi, cura, mitigazione, trattamento o prevenzione di una malattia in uomini o altri animali, o per migliorare altrimenti la salute fisica o mentale di uomini o animali. Esempi di molecole biologicamente attive comprendono, ma senza essere limitate a questi, peptidi, proteine, enzimi, farmaci a molecola piccola, farmaci pesanti, farmaci leggeri, profarmaci, carboidrati, atomi o molecole inorganici, coloranti, lipidi, nucleosidi, radionuclidi, oligonucleotidi, tossine, cellule, virus, liposomi, microparticelle e micelle. Classi di agenti biologicamente attivi che sono adatti per l'uso con i metodi e le composizioni descritti in questa sede comprendono, ma senza essere limitati a questi, farmaci, profarmaci, radionuclidi, agenti per la formazione di immagini, polimeri, antibiotici, fungicidi, agenti anti-virali, agenti anti-infiammatori, agenti anti-tumore, agenti cardiovascolari, agenti anti-ansia, ormoni, fattori della crescita, agenti steroidei e non steroidei, tossine derivate microbicamente e simili.

Con "modulazione dell'attività biologica" si intende l'aumento o la diminuzione della reattività di un polipeptide, l'alterazione della selettività del polipeptide, l'aumento o la diminuzione della selettività per il substrato del polipeptide. L'analisi dell'attività biologica modificata può venire eseguita confrontando l'attività biologica del polipeptide non naturale con quella del polipeptide naturale.

In alcuni aspetti, la descrizione si riferisce ad amminoacidi che sono stati incorporati biosinteticamente nell'anticorpo. Il termine "biosinteticamente", quando usato in questa sede, si riferisce a qualsiasi metodo che utilizza un sistema di traduzione (cellulare o non cellulare), compreso l'uso di almeno uno dei componenti

seguenti: un polinucleotide, un codone, un tRNA e un liposoma. A titolo di esempio, amminoacidi non naturali possono venire “incorporati biosinteticamente” in polipeptidi di amminoacidi non naturali usando i metodi e le tecniche descritti in questa sede e come è ben noto nella tecnica. Vedere, per esempio, WO2010/011735 e WO2005/074650.

L’espressione “varianti modificate conservativamente” si applica sia ad amminoacidi naturali e non naturali che a sequenze di acido nucleico naturali e non naturali, e loro combinazioni. Con riferimento a sequenze di acido nucleico particolari, “varianti modificate conservativamente” si riferiscono a quegli acidi nucleici naturali e non naturali che codificano sequenze amminoacidiche naturali e non naturali identiche o essenzialmente identiche, o in cui l’acido nucleico naturale e non naturale non codifica una sequenza amminoacidica naturale e non naturale, a sequenze essenzialmente identiche. A titolo di esempio, a causa della degenerazione del codice genetico, un gran numero di acidi nucleici funzionalmente identici codificano qualsiasi data proteina. Per esempio, i codoni GCA, GCC, GCG e GCU codificano tutti l’amminoacido alanina. Quindi, presso ogni posizione in cui una alanina viene specificata mediante un codone, il codone può venire alterato a qualsiasi dei codoni corrispondenti descritti senza alterare il polipeptide codificato. Tali variazioni di acido nucleico sono “variazioni silenziose”, le quali sono una specie di variazioni modificate conservativamente. Quindi, a titolo di esempio, ogni sequenza di acido nucleico naturale o non naturale in questa sede che codifica un polipeptide naturale o non naturale descrive anche ogni variazione silente possibile dell’acido nucleico naturale o non naturale. Una persona di ordinaria esperienza nella tecnica riconoscerà che ciascun codone in un acido nucleico naturale o non naturale (ad eccezione di AUG, che è ordinariamente l’unico codone per metionina, e TGG, che è ordinariamente l’unico codone per triptofano) può venire modificato per fornire una molecola funzionalmente identica. Per conseguenza, ciascuna variazione silente di un acido nucleico naturale e non naturale che codifica un polipeptide naturale e non naturale è implicita in ciascuna sequenza descritta. Per quanto riguarda le sequenze amminoacidiche, singole sostituzioni, delezioni o addizioni a una sequenza di acido nucleico, peptide, polipeptide o proteina che alterano, aggiungono o deletano un singolo amminoacido naturale e non naturale o una piccola percentuale di amminoacidi naturali e non naturali nella sequenza codificata sono una “variante

conservativamente modificata”, in cui l’alterazione porta alla delezione di un amminoacido, aggiunta di un amminoacido o sostituzione di un amminoacido naturale e non naturale con un amminoacido chimicamente simile. Tabelle di sostituzioni conservative che forniscono amminoacidi naturali funzionalmente simili sono ben note nella tecnica. Tabelle di sostituzioni conservative che forniscono amminoacidi funzionalmente simili sono ben note alle persone di ordinaria esperienza nella tecnica. I seguenti otto gruppi contengono ciascuno amminoacidi che sono sostituzioni conservative fra di loro: 1) alanina (A), glicina (G); 2) acido aspartico (D), acido glutammico (E); 3) asparagina (N), glutammina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W); 7) serina (S), treonina (T); e 8) cisteina (C), metionina (M) (vedere, per esempio, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2^a edizione, 1993). Tali varianti modificate conservativamente sono in aggiunta a e non escludono varianti polimorfiche, omologhi interspecie e alleli delle composizioni descritte in questa sede.

Il termine “farmaco”, quando usato in questa sede, si riferisce a qualsiasi sostanza usata nella prevenzione, diagnosi, alleviamento, trattamento o cura di una malattia o condizione come cancro, compreso cancro della prostata.

L’espressione “quantità efficace”, quando usata in questa sede, si riferisce a una quantità sufficiente di un agente, un composto o una composizione che viene somministrata che allevierà fino a un certo punto uno o più dei sintomi della malattia o condizione che viene trattata. Il risultato può essere una riduzione e/o un alleviamento dei segni, sintomi o cause di una malattia, o qualsiasi altra alterazione desiderata di un sistema biologico. A titolo di esempio, un agente, un composto o una composizione che vengono somministrati comprendono, ma senza essere limitati a questi, un polipeptide di amminoacidi naturali, un polipeptide di amminoacidi non naturali, un polipeptide di amminoacidi naturali modificati, un polipeptide non di amminoacidi modificati, o un anticorpo o sua variante. Composizioni contenenti tali polipeptidi di amminoacidi naturali, polipeptidi di amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali modificati, polipeptidi di amminoacidi non naturali modificati, o un anticorpo o sua variante possono venire somministrate per trattamenti profilattici, di potenziamento e/o terapeutici. Una quantità “efficace” appropriata in qualsiasi singolo caso può venire determinata usando tecniche

come uno studio di aumento della dose.

I termini “potenziare” o “potenziamento” significano aumentare o prolungare la potenza o la durata di un effetto desiderato. A titolo di esempio, il “potenziamento” dell’effetto di agenti terapeutici si riferisce alla capacità di aumentare o prolungare, in potenza o durata, l’effetto di agenti terapeutici durante il trattamento di una malattia, un disturbo o una condizione. Una “quantità efficace per il potenziamento”, quando usata in questa sede, si riferisce a una quantità adeguata per potenziare l’effetto di un agente terapeutico nel trattamento di una malattia, un disturbo o una condizione. Quando usate in un paziente, quantità efficaci per questo uso dipenderanno dalla gravità e dall’andamento della malattia, del disturbo o della condizione, dalla terapia precedente, dallo stato di salute e dalla risposta ai farmaci del paziente, e dal giudizio del medico curante.

L’espressione “anticorpo umanizzato o chimerico” si riferisce a una molecola, preparata generalmente usando tecniche ricombinanti, avente un sito di legame per l’antigene derivato da una immunoglobulina ottenuta da una specie non umana (per esempio murina), e la struttura di immunoglobulina rimanente della molecola basata sulla struttura e/o sequenza di una immunoglobulina umana. In generale, l’anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutti di almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte delle anse ipervariabili corrispondono a quelle di una immunoglobulina non umana e tutti o sostanzialmente tutti dei residui/regioni strutturali (FR) sono quelli di una sequenza di immunoglobulina umana. L’anticorpo umanizzato comprenderà anche opzionalmente almeno una porzione di una regione costante (Fc) di immunoglobulina, tipicamente quella di una immunoglobulina umana. Le forme umanizzate di anticorpi di roditore comprenderanno essenzialmente le stesse sequenze di CDR degli anticorpi di roditore parentali, sebbene certe sostituzioni di amminoacido possano venire incluse per aumentare l’affinità, aumentare la stabilità dell’anticorpo umanizzato o per altre ragioni. Tuttavia, quando scambi dell’ansa di CDR non portano uniformemente a un anticorpo con le stesse proprietà di legame dell’anticorpo di origine, cambiamenti nei residui strutturali (FR), residui coinvolti nel supporto dell’ansa di CDR, possono anche venire introdotti in anticorpi umanizzati per conservare l’affinità di legame per l’antigene. Il sito per il legame dell’antigene può comprendere domini variabili completi fusi su domini costanti, o solamente le regioni determinanti la complementarità (CDR)

innestate su regioni strutturali appropriate nei domini variabili. Siti di legame per l'antigene possono essere di tipo selvatico o modificati tramite una o più sostituzioni di amminoacido. Questo elimina la regione costante come un immunogene in individui umani, ma rimane la possibilità di una risposta immunitaria verso la regione variabile estranea (LoBuglio, A. F. et al., "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:4220-4224, 1989). Un altro approccio si focalizza non solo sul fornire regioni costanti derivate dall'uomo, ma modifica le regioni variabili come pure le rimodella il più vicino possibile alla forma umana. È noto che le regioni variabili di entrambe le catene pesante e leggera contengono tre regioni determinanti la complementarità (CDR) che variano in risposta agli antigeni in questione e determinano la capacità di legame, affiancate da quattro regioni strutturali (FR) che sono relativamente conservate in una data specie e che forniscono putativamente una impalcatura per le CDR. Quando anticorpi non umani vengono preparati con riferimento a un particolare antigene, le regioni variabili possono venire "umanizzate" innestando CDR derivate da un anticorpo non umano sulle FR presenti nell'anticorpo umano da modificare. L'applicazione di questo approccio a vari anticorpi è stato riportato da Kettleborough, C. A. et al., "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783,1991; Co, M. S. et al., "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:2869-2873,1991; Carter, P. et al., "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:4285-4289,1992; e Co, M. S. et al., "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154,1992. In alcuni aspetti, anticorpi umanizzati conservano tutte le sequenze di CDR (per esempio un anticorpo di topo umanizzato che contiene tutte e sei le CDR derivate da anticorpi di topo). In altri aspetti, anticorpi umanizzati hanno una o più CDR (una, due, tre, quattro, cinque, sei) che sono state alterate con riferimento all'anticorpo originale, le quali vengono anche denominate una o più CDR "derivate da" una o più CDR ottenute dall'anticorpo originale.

Il termine "identiche", quando usato in questa sede, si riferisce a due o più sequenze o sottosequenze che sono

uguali. Inoltre, l'espressione "sostanzialmente identiche", quando usata in questa sede, si riferisce a due o più sequenze che hanno una percentuale di unità sequenziali che sono uguali, quando confrontate e allineate per la corrispondenza massima su una finestra di confronto, o regioni designate quando misurate usando algoritmi di confronto o mediante allineamento manuale e ispezione visiva. Solamente a titolo di esempio, due o più sequenze possono essere "sostanzialmente identiche" se le unità sequenziali sono identiche per circa il 60%, identiche per circa il 65%, identiche per circa il 70%, identiche per circa il 75%, identiche per circa l'80%, identiche per circa l'85%, identiche per circa il 90% o identiche per circa il 95% su una regione specificata. Tali percentuali descrivono la "identità percentuale" di due o più sequenze. L'identità di una sequenza può esistere su una regione che ha una lunghezza di almeno circa 75-100 unità sequenziali, su una regione che ha una lunghezza di circa 50 unità sequenziali o, ove non specificato, sull'intera sequenza. Questa definizione si riferisce anche al complemento di una sequenza di test. Solamente a titolo di esempio, due o più sequenze polipeptidiche sono identiche quando i residui amminoacidici sono gli stessi, mentre due o più sequenze polipeptidiche sono "sostanzialmente identiche" se i residui amminoacidici sono identici per circa il 60%, identici per circa il 65%, identici per circa il 70%, identici per circa il 75%, identici per circa l'80%, identici per circa l'85%, identici per circa il 90% o identici per circa il 95% su una regione specificata. L'identità può esistere su una regione che ha una lunghezza da almeno circa 75 fino a circa 100 amminoacidi, su una regione che ha una lunghezza di circa 50 amminoacidi o, ove non specificato, sull'intera sequenza di una sequenza polipeptidica. Inoltre, solamente a titolo di esempio, due o più sequenze polinucleotidiche sono identiche quando i residui di acido nucleico sono uguali, mentre due o più sequenze polinucleotidiche sono "sostanzialmente identiche" se i residui di acido nucleico sono identici per circa il 60%, identici per circa il 65%, identici per circa il 70%, identici per circa il 75%, identici per circa l'80%, identici per circa l'85%, identici per circa il 90% o identici per circa il 95% su una regione specificata. L'identità può esistere su una regione che ha una lunghezza da almeno circa 75 fino a circa 100 acidi nucleici, su una regione che ha una lunghezza di circa 50 acidi nucleici o, ove non specificato, sull'intera sequenza di una sequenza polinucleotidica.

Il termine "immunogenicità", quando usato in questa sede, si riferisce a una risposta anticorpale alla

somministrazione di un farmaco terapeutico. L'immunogenicità verso polipeptidi di amminoacidi non naturali terapeutici può venire ottenuta usando saggi quantitativi e qualitativi per la rilevazione di anticorpi anti-polipeptidi di amminoacidi non naturali in fluidi biologici. Tali saggi comprendono, ma senza essere limitati a questi, radioimmunosaggio (RIA), saggio con immunoadsorbente legato a un enzima (ELISA), immunosaggio luminescente (LIA) e immunosaggio fluorescente (FIA). L'analisi dell'immunogenicità verso polipeptidi di amminoacidi non naturali terapeutici comporta il confronto della risposta anticorpale dopo somministrazione dei polipeptidi di amminoacidi non naturali terapeutici con la risposta anticorpale dopo somministrazione di polipeptidi di amminoacidi naturali terapeutici.

Il termine "isolato", quando usato in questa sede, si riferisce alla separazione e rimozione di un componente di interesse da componenti non di interesse. Sostanze isolate possono essere in uno stato anidro o semi-anidro, o in soluzione, compresa, ma senza essere limitata a questa, una soluzione acquosa. Il componente isolato può essere in uno stato omogeneo o il componente isolato può fare parte di una composizione farmaceutica che comprende veicolanti e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili aggiuntivi. La purezza e l'omogeneità possono venire determinate usando tecniche di chimica analitica comprendenti, ma senza essere limitate a queste, elettroforesi su gel di poliacrilammide o cromatografia liquida ad alta prestazione. Inoltre, quando un componente di interesse viene isolato ed è la specie predominante presente in una preparazione, il componente viene descritto in questa sede come sostanzialmente purificato. Il termine "purificato", quando usato in questa sede, può riferirsi a un componente di interesse che è puro per almeno l'85%, puro per almeno il 90%, puro per almeno il 95%, puro per almeno il 99% o più. Solamente a titolo di esempio, acidi nucleici o proteine sono "isolati" quando tali acidi nucleici o proteine sono privi di almeno alcuni dei componenti cellulari con i quali sono associati nello stato naturale, o che l'acido nucleico o la proteina sono stati concentrati a un livello superiore rispetto alla concentrazione della loro produzione *in vivo* o *in vitro*. Inoltre, a titolo di esempio, un gene viene isolato quando separato da griglie di lettura aperta che affiancano il gene e codificano una proteina diversa dal gene di interesse. Il termine "legame", quando usato in questa sede, si riferisce a legami o a una parte chimica formati da una reazione chimica fra il gruppo funzionale di un legante e un'altra molecola. Tali legami possono comprendere,

ma senza essere limitati a questi, legami covalenti e legami non covalenti, mentre tali parti chimiche possono comprendere, ma senza essere limitate a questi, esteri, carbonati, esteri fosfato di immine, idrazoni, acetali, ortoesteri, legami peptidici e legami oligonucleotidici. Legami idroliticamente stabili significano che i legami sono sostanzialmente stabili in acqua e non reagiscono con acqua a valori di pH utili comprendenti, ma senza essere limitati a questi, in condizioni fisiologiche per un periodo prolungato di tempo, forse anche in modo indefinito. Legami idroliticamente instabili o degradabili significano che i legami sono degradabili in acqua o in soluzioni acquose comprendenti, per esempio, il sangue. Legami enzimaticamente instabili o degradabili significano che il legame può venire degradato mediante uno o più enzimi. Solamente a titolo di esempio, PEG e polimeri correlati possono includere legami degradabili nella catena principale del polimero o nel gruppo legante fra la catena principale del polimero e uno o più dei gruppi funzionali terminali della molecola di polimero. Tali legami degradabili comprendono, ma senza essere limitati a questi, legami estere formati tramite la reazione di acidi carbossilici PEG o acidi carbossilici PEG attivati con gruppi di alcool su un agente biologicamente attivo, in cui tali gruppi estere generalmente idrolizzano in condizioni fisiologiche per rilasciare l'agente biologicamente attivo. Altri legami idroliticamente degradabili comprendono, ma senza essere limitati a questi, legami carbonato; legami immidici derivati dalla reazione di una ammina e una aldeide; legami di estere fosfato formati facendo reagire un alcool con un gruppo fosfato; legami di idrazone che sono il prodotto di reazione di una idrazide e una aldeide; legami di acetale che sono il prodotto di reazione di una aldeide e un alcool; legami di ortoestere che sono il prodotto di reazione di un formiato e un alcool; legami peptidici formati da un gruppo di ammina compresa, ma senza essere limitata a questa, a una estremità di un polimero come PEG, e un gruppo carbossile di un peptide; e legami oligonucleotidici formati tramite un gruppo fosforamidite compresa, ma senza essere limitata a questa, all'estremità di un polimero, e un gruppo ossidrilico in 5' di un oligonucleotide.

Il termine "metabolita", quando usato in questa sede, si riferisce a un derivato di un composto, a titolo di esempio un polipeptide di amminoacidi naturali, un polipeptide di amminoacidi non naturali, un polipeptide di amminoacidi naturali modificati o un polipeptide di amminoacidi non naturali modificati, che viene formato quando il composto, a titolo di esempio un polipeptide di amminoacidi naturali, un polipeptide di amminoacidi

non naturali, un polipeptide di amminoacidi naturali modificati o un polipeptide di amminoacidi non naturali modificati, viene metabolizzato. L'espressione "metabolita farmaceuticamente attivo" o "metabolita attivo" si riferisce a un derivato biologicamente attivo di un composto, a titolo di esempio un polipeptide di amminoacidi naturali, un polipeptide di amminoacidi non naturali, un polipeptide di amminoacidi naturali modificati o un polipeptide di amminoacidi non naturali modificati, che viene formato quando tale composto, a titolo di esempio un polipeptide di amminoacidi naturali, un polipeptide di amminoacidi non naturali, un polipeptide di amminoacidi naturali modificati o un polipeptide di amminoacidi non naturali modificati, viene metabolizzato.

Il termine "metabolizzata", quando usato in questa sede, si riferisce alla somma dei processi tramite i quali una particolare sostanza viene cambiata da parte di un organismo. Tali processi comprendono, ma senza essere limitati a queste, reazioni di idrolisi e reazioni catalizzate da enzimi. Una ulteriore informazione sul metabolismo può venire ottenuta da *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Edizione, McGraw-Hill (1996). Solamente a titolo di esempio, metaboliti di polipeptidi di amminoacidi naturali, polipeptidi di amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali modificati o polipeptidi di amminoacidi non naturali modificati possono venire identificati tramite somministrazione dei polipeptidi di amminoacidi naturali, polipeptidi di amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali modificati o polipeptidi di amminoacidi non naturali modificati a un ospite e analisi di campioni di tessuto ottenuti dall'ospite, o mediante incubazione di polipeptidi di amminoacidi naturali, polipeptidi di amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali modificati o polipeptidi di amminoacidi non naturali modificati con cellule epatiche *in vitro* e analisi dei composti risultanti.

Il termine "modificato", quando usato in questa sede, si riferisce alla presenza di un cambiamento a un amminoacido naturale, un amminoacido non naturale, un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali. Tali cambiamenti, o modifiche, possono venire ottenuti mediante modifiche post-sintesi di amminoacidi naturali, amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali o polipeptidi di amminoacidi non naturali, o mediante modifica co-traslazionale o post-traslazionale di amminoacidi naturali, amminoacidi non naturali, polipeptidi di amminoacidi naturali o polipeptidi di amminoacidi non naturali.

Un "amminoacido non naturale" si riferisce a un amminoacido che non è uno dei 20 amminoacidi comuni o

pirrolisina o selenocisteina. Altre espressioni che possono venire usate come sinonimi con l'espressione "amminoacido non naturale" sono "amminoacido codificato non naturalmente", "amminoacido innaturale", "amminoacido non presente in natura" e loro versioni variamente dotate di trattino e non dotate di trattino. L'espressione "amminoacido non naturale" comprende, ma non è limitata a questi, amminoacidi che si presentano in modo naturale tramite modifica di un amminoacido codificato in modo naturale (comprensente, ma senza essere limitato a questi, i 20 amminoacidi comuni o pirrolisina e selenocisteina), ma non sono essi stessi incorporati in una catena polipeptidica in crescita mediante il complesso di traduzione. Esempi di amminoacidi presenti in natura che non sono codificati in modo naturale comprendono, ma senza essere limitati a questi, N-acetilglucosamminil-L-serina, N-acetilglucosamminil-L-treonina e O-fosfotirosina. Inoltre, l'espressione "amminoacido non naturale" comprende, ma senza essere limitata a questi, amminoacidi che non si presentano in modo naturale e possono venire ottenuti sinteticamente o possono venire ottenuti mediante modifica di amminoacidi non naturali.

L'espressione "acido nucleico", quando usata in questa sede, si riferisce a deossiribonucleotidi, deossiribonucleosidi, ribonucleosidi o ribonucleotidi e loro polimeri, in forma a filamento singolo o doppio. Solamente a titolo di esempio, tali acidi nucleici e polimeri di acido nucleico comprendono, ma senza essere limitati a questi, (i) analoghi di nucleotidi naturali che presentano proprietà di legame simili come un acido nucleico di riferimento che vengono metabolizzati in un modo simile a nucleotidi presenti in natura; (ii) analoghi di oligonucleotide comprendenti, ma senza essere limitati a questi, PNA (acido peptidonucleico), analoghi di DNA usati in tecnologia antisense (fosforotioati, fosforammidati e simili); (iii) loro varianti modificate conservativamente (comprensenti, ma senza essere limitate a queste, sostituzioni di codone degenerato) e sequenze complementari e sequenze indicate esplicitamente. A titolo di esempio, sostituzioni del codone degenerato possono venire ottenute generando sequenze in cui la terza posizione di uno o più (o tutti) codoni scelti viene sostituita con residui di base mista e/o deossiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; e Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

L'espressione "farmaceuticamente accettabile", quando usata in questa sede, si riferisce a un materiale

comprendente, ma non limitato a, un sale, legante, adiuvante, eccipiente, veicolante o diluente, che non annulla l'attività biologica o le proprietà del composto, ed è relativamente non tossico, cioè il materiale può venire somministrato a un individuo senza causare effetti biologici indesiderabili o interagire in un modo dannoso con qualsiasi dei componenti della composizione nella quale è contenuto.

In alcuni aspetti, la descrizione riguarda polimeri. Il termine "polimero", quando usato in questa sede, si riferisce a una molecola costituita da subunità ripetute. Tali molecole comprendono, ma senza essere limitate a queste, polipeptidi, polinucleotidi, o polisaccaridi o polialchilenglicoli. I polimeri della descrizione possono essere polieterpolioli polimerici lineari o ramificati comprendenti, ma senza essere limitati a questi, polietilenglicole, polipropilenglicole, polibutilenglicole e loro derivati. Altri aspetti esemplificativi sono elencati, per esempio, in cataloghi di fornitori del commercio come il catalogo della Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001). Solamente a titolo di esempio, tali polimeri hanno pesi molecolari medi fra circa 0,1 kDa e circa 100 kDa. Tali polimeri comprendono, ma senza essere limitati a questi, fra circa 100 Da e circa 100.000 Da o più. Il peso molecolare del polimero può essere fra circa 100 Da e circa 100.000 Da compresi, ma senza essere limitati a questi, circa 100.000 Da, circa 95.000 Da, circa 90.000 Da, circa 85.000 Da, circa 80.000 Da, circa 75.000 Da, circa 70.000 Da, circa 65.000 Da, circa 60.000 Da, circa 55.000 Da, circa 50.000 Da, circa 45.000 Da, circa 40.000 Da, circa 35.000 Da, circa 30.000 Da, circa 25.000 Da, circa 20.000 Da, circa 15.000 Da, circa 10.000 Da, circa 9.000 Da, circa 8.000 Da, circa 7.000 Da, circa 6.000 Da, circa 5.000 Da, circa 4.000 Da, circa 3.000 Da, circa 2.000 Da, circa 1.000 Da, circa 900 Da, circa 800 Da, circa 700 Da, circa 600 Da, circa 500 Da, 400 Da, circa 300 Da, circa 200 Da e circa 100 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 100 Da e circa 50.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 100 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 1.000 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 2.000 e circa 50.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 5.000 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del polimero è fra circa 10.000 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, la molecola di poli(etilenglicole) è un polimero ramificato. Il peso molecolare del PEG a catena ramificata può essere fra circa

1.000 Da e circa 100.000 Da compresi, ma senza essere limitati a questi, circa 100.000 Da, circa 95.000 Da, circa 90.000 Da, circa 85.000 Da, circa 80.000 Da, circa 75.000 Da, circa 70.000 Da, circa 65.000 Da, circa 60.000 Da, circa 55.000 Da, circa 50.000 Da, circa 45.000 Da, circa 40.000 Da, circa 35.000 Da, circa 30.000 Da, circa 25.000 Da, circa 20.000 Da, circa 15.000 Da, circa 10.000 Da, circa 9.000 Da, circa 8.000 Da, circa 7.000 Da, circa 6.000 Da, circa 5.000 Da, circa 4.000 Da, circa 3.000 Da, circa 2.000 Da e circa 1.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del PEG a catena ramificata è fra circa 1.000 Da e circa 50.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del PEG a catena ramificata è fra circa 1.000 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del PEG a catena ramificata è fra circa 5.000 Da e circa 40.000 Da. In alcuni aspetti, il peso molecolare del PEG a catena ramificata è fra circa 5.000 Da e circa 20.000 Da. In altri aspetti, il peso molecolare del PEG a catena ramificata è fra circa 2.000 e circa 50.000 Da. Il termine “PEGilazione” o “PEGilato” intende riferirsi alla formazione di legame covalente fra l'amminoacido sintetico specificato e una molecola di polietilenglicole (PEG). Il metodo può comprendere il portare in contatto un polipeptide di ADC α -PSMA isolato comprendente un amminoacido sintetico con un polimero solubile in acqua comprendente una parte che reagisce con l'amminoacido sintetico.

I termini “polipeptide”, “peptide” e “proteina” vengono usati in modo intercambiabile in questa sede per riferirsi a un polimero di residui amminoacidici. Vale a dire, una descrizione rivolta a un polipeptide si applica in modo uguale a una descrizione di un peptide e una descrizione di una proteina, e viceversa. I termini si applicano a polimeri di amminoacidi presenti in natura come pure a polimeri di amminoacidi in cui uno o più residui amminoacidici sono un amminoacido non naturale. Inoltre, tali “polipeptidi”, “peptidi” e “proteine” comprendono catene di amminoacidi di qualsiasi lunghezza, comprese proteine a lunghezza intera, in cui i residui amminoacidici sono legati mediante legami peptidici covalenti.

L'espressione “modificato post-traslazionalmente” si riferisce a qualsiasi modifica di un amminoacido naturale o non naturale che si verifica dopo che tale amminoacido è stato incorporato traslazionalmente in una catena polipeptidica. Tali modifiche comprendono, ma senza essere limitate a queste, modifiche *in vivo* co-traslazionali, modifiche *in vitro* co-traslazionali (come in un sistema di traduzione privo di cellule), modifiche *in vivo* post-

traslazionali e modifiche *in vitro* post-traslazionali.

L'espressione "profarmaco" o "profarmaco farmaceuticamente accettabile", quando usata in questa sede, si riferisce a un agente che viene convertito nel farmaco parente *in vivo* o *in vitro*, il quale non annulla l'attività biologica o le proprietà del farmaco, ed è relativamente non tossico, cioè il materiale può venire somministrato a un individuo senza causare effetti biologici indesiderabili o interagire in un modo dannoso con qualsiasi dei componenti della composizione nella quale è contenuto. I profarmaci sono in generale precursori di farmaco che, dopo somministrazione a un soggetto e successivo assorbimento, vengono convertiti a un prodotto attivo, o una specie più attiva, tramite alcuni processi, come conversione mediante un percorso metabolico. Alcuni profarmaci hanno un gruppo chimico presente sul profarmaco che lo rende meno attivo e/o conferisce solubilità o qualche altra proprietà al farmaco. Quando il gruppo chimico è stato scisso e/o modificato dal profarmaco, viene generato il farmaco attivo. I profarmaci vengono convertiti in farmaco attivo all'interno del corpo attraverso reazioni enzimatiche o non enzimatiche. I profarmaci possono fornire proprietà fisicochimiche migliorate come migliore solubilità, caratteristiche di somministrazione potenziate come indirizzamento specifico a una cellula, un tessuto, un organo o un ligando particolari, e valore terapeutico migliorato del farmaco. I benefici di tali profarmaci comprendono, ma senza essere limitati a questi, (i) facilità di somministrazione rispetto al farmaco parente; (ii) il profarmaco può essere biodisponibile mediante somministrazione orale, mentre il parente non lo è; e (iii) il profarmaco può anche avere solubilità migliorata in composizioni farmaceutiche rispetto al farmaco parente. Un profarmaco comprende un derivato farmacologicamente inattivo, o ad attività ridotta, di un farmaco attivo. I profarmaci possono venire progettati per modulare la quantità di un farmaco o molecola biologicamente attiva che raggiunge un sito di azione desiderato tramite la manipolazione delle proprietà di un farmaco, come proprietà fisicochimiche, biofarmaceutiche o farmacocinetiche. Un esempio, senza limitazione, di un profarmaco potrebbe essere un polipeptide di amminoacidi non naturali che viene somministrato come un estere (il "profarmaco") per facilitare la trasmissione attraverso una membrana cellulare ove la solubilità in acqua è dannosa per la mobilità, e che viene quindi idrolizzato metabolicamente all'acido carbossilico, l'entità attiva, quando all'interno della cellula ove la solubilità in acqua è vantaggiosa. I profarmaci possono venire progettati

come derivati di farmaco reversibili, per l'uso come modificatori per potenziare il trasporto del farmaco verso tessuti sito-specifici.

L'espressione "quantità profilatticamente efficace", quando usata in questa sede, si riferisce a una quantità di una composizione contenente almeno un polipeptide di amminoacidi non naturali o almeno un polipeptide di amminoacidi non naturali modificati applicata profilatticamente a un paziente che allevierà fino a un certo punto uno o più dei sintomi di una malattia, condizione o disturbo che vengono trattati. In tali applicazioni profilattiche, tali quantità possono dipendere dallo stato di salute, dal peso e simili del paziente. Viene considerato bene entro l'esperienza della tecnica per una persona il determinare tali quantità profilatticamente efficaci mediante sperimentazione ordinaria comprendente, ma senza essere limitata a questa, una prova clinica di aumento della dose.

L'espressione "cellula ospite ricombinante", anche indicata come "cellula ospite", si riferisce a una cellula che comprende un polinucleotide esogeno, in cui i metodi usati per inserire il polinucleotide esogeno in una cellula comprendono, ma senza essere limitati a questi, assunzione diretta, trasduzione, f-mating o altri metodi noti nella tecnica per creare cellule ospiti ricombinanti. Solamente a titolo di esempio, tale polinucleotide esogeno può essere un vettore non integrato comprendente, ma senza essere limitato a questo, un plasmide, o può venire integrato nel genoma dell'ospite.

Il termine "soggetto", quando usato in questa sede, si riferisce a un animale che è l'oggetto del trattamento, osservazione o esperimento. Solamente a titolo di esempio, un soggetto può essere, ma senza essere limitato a questo, un mammifero comprendente, ma senza essere limitato a questo, un uomo.

L'espressione "sostanzialmente purificato", quando usata in questa sede, si riferisce a un componente di interesse che può essere sostanzialmente o essenzialmente privo di altri componenti che normalmente accompagnano, o interagiscono con, il componente di interesse prima della purificazione. Solamente a titolo di esempio, un componente di interesse può essere "sostanzialmente purificato" quando la preparazione del componente di interesse contiene meno di circa il 30%, meno di circa il 25%, meno di circa il 20%, meno di circa il 15%, meno di circa il 10%, meno di circa il 5%, meno di circa il 4%, meno di circa il 3%, meno di circa

il 2% o meno di circa l'1% (in peso secco) di componenti contaminanti. Quindi, un componente di interesse “sostanzialmente purificato” può avere un livello di purezza di circa il 70%, circa il 75%, circa l'80%, circa l'85%, circa il 90%, circa il 95%, circa il 96%, circa il 97%, circa il 98%, circa il 99% o più. Solamente a titolo di esempio, un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali può venire purificato da una cellula nativa, o una cellula ospite nel caso di polipeptidi di amminoacidi naturali o polipeptidi di amminoacidi non naturali prodotti ricombinantemente. A titolo di esempio, una preparazione di un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali può essere “sostanzialmente purificata” quando la preparazione contiene meno di circa il 30%, meno di circa il 25%, meno di circa il 20%, meno di circa il 15%, meno di circa il 10%, meno di circa il 5%, meno di circa il 4%, meno di circa il 3%, meno di circa il 2% o meno di circa l'1% (in peso secco) di materiale contaminante. A titolo di esempio, quando un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali viene prodotto ricombinantemente mediante cellule ospiti, il polipeptide di amminoacidi naturali o il polipeptide di amminoacidi non naturali può essere presente a circa il 30%, circa il 25%, circa il 20%, circa il 15%, circa il 10%, circa il 5%, circa il 4%, circa il 3%, circa il 2% o circa l'1% o meno del peso secco delle cellule. A titolo di esempio, quando un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali viene prodotto ricombinantemente mediante cellule ospiti, il polipeptide di amminoacidi naturali o il polipeptide di amminoacidi non naturali può essere presente nel terreno di coltura a circa 5 g/l, circa 4 g/l, circa 3 g/l, circa 2 g/l, circa 1 g/l, circa 750 mg/l, circa 500 mg/l, circa 250 mg/l, circa 100 mg/l, circa 50 mg/l, circa 10 mg/l o circa 1 mg/l o meno del peso secco delle cellule. A titolo di esempio, polipeptidi di amminoacidi naturali o polipeptidi di amminoacidi non naturali “sostanzialmente purificati” possono avere un livello di purezza di circa il 30%, circa il 35%, circa il 40%, circa il 45%, circa il 50%, circa il 55%, circa il 60%, circa il 65%, circa il 70%, circa il 75%, circa l'80%, circa l'85%, circa il 90%, circa il 95%, circa il 99% o più quando determinata mediante metodi appropriati comprendenti, ma senza essere limitati a questi, analisi con SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC ed elettroforesi capillare.

L'espressione “quantità terapeuticamente efficace”, quando usata in questa sede, si riferisce alla quantità di una composizione contenente almeno un polipeptide di amminoacidi non naturali e/o almeno un polipeptide di

amminoacidi non naturali modificati somministrata a un paziente già affetto da una malattia, una condizione o un disturbo, sufficiente per curare o almeno parzialmente arrestare, o alleviare, fino a un certo punto uno o più dei sintomi della malattia, disturbo o condizione che vengono trattati. L'efficacia di tali composizioni dipende da condizioni comprendenti, ma senza essere limitate a questi, la gravità e l'andamento della malattia, del disturbo o della condizione, la terapia precedente, lo stato di salute e la risposta ai farmaci del paziente, e il giudizio del medico curante. Solamente a titolo di esempio, quantità terapeuticamente efficaci possono venire determinate mediante sperimentazione ordinaria comprendente, ma senza essere limitata a questa, una prova clinica di aumento della dose.

L'espressione "tossico" o "parte tossica" o "gruppo tossico" o "citotossico" o "carico utile citotossico" o "carico utile", quando usata in questa sede, si riferisce a un composto che può provocare danno, disturbi o morte. Parti tossiche comprendono, ma senza essere limitate a questi, auristatina, agente di legame del solco minore del DNA, agente alchilante il solco minore del DNA, enediina, lexitropsina, duocarmicina, tassano, puromicina, dolastatina, maitansinoide, alcaloide vinca, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina-10, echinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, netropsina, podofilottossina (per esempio etoposide, teniposide, ecc.), baccatina e suoi derivati, agenti anti-tubulina, criptofisina, combretastatina, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotilone A, epotilone B, nocodazolo, colchicine, colcimid, estramustina, cemadotin, discodermolide, maitansina, eleuterobina, mecloretammina, ciclofosfamide, melphalan, carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, clorozotocina, mostarda di uracile, clormetina, ifosfamide, clorambucile, pipobromano, trietilenmelammina, trietilenfosforammina, busulfan, dacarbazina e temozolomide, itarabina, citosina arabinoside, fluorouracile, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, pentostatina, 5-fluorouracile, metotrexato, 10-propargil-5,8-dideazafolato, acido 5,8-dideazatetraidrofolic, leucovorina, fludarabina fosfato, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, deossicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasi, azatioprina, brequinar, antibiotici (per esempio antraciclina, gentamicina, cefalotin, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina,

rociromicina, furazolidone, amoxicillina, ampicillina, carbenicillina, flucloxacillina, meticillina, penicillina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, doxiciclina, minociclina, ossitetraciclina, tetraciclina, streptomina, rifabutin, etambutolo, rifaximina, ecc.), farmaci antivirali (per esempio abacavir, acyclovir, ampligen, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazone, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, stavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, ecc.), daunorubicina cloridrato, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarubicina, doxorubicina, epirubicina e derivati di morfolino, bisciclopeptidi di fenossizone (per esempio dactinomicina), glicopeptidi basici (per esempio bleomicina), glicosidi di antrachinone (per esempio plicamicina, mitramicina), antracendioni (per esempio mitoxantrone), azirinopirroloindoldioni (per esempio mitomicina), immunosoppressori macrociclici (per esempio ciclosporina, FK-506, tacrolimo, prograf, rapamicina, ecc.), navelbene, CPT-11, anastrozolo, letrozolo, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamide, ifosammide, droloxafina, allocolchicina, alicondrina B, colchicina, derivati di colchicina, maitansina, rizoxina, paclitaxel, derivati di paclitaxel, docetaxel, tiocolchicina, tritilcisterina, vinblastina solfato, vincristina solfato, cisplatino, carboplatino, idrossiurea, N-metilidrazina, epidofillotossina, procarbazona, mitoxantrone, leucovorina e tegafur. “Tassani” comprendono paclitaxel, come pure qualsiasi derivato o pro-farmaco di tassano attivo.

Il termine “trattare”, “trattando” o “trattamento”, quando usato in questa sede, comprende alleviare, prevenire, diminuire o migliorare i sintomi di una malattia o condizione, prevenire sintomi addizionali, migliorare o prevenire le cause metaboliche sottostanti i sintomi, inibire la malattia o condizione, per esempio arrestare lo sviluppo della malattia o condizione, alleviare la malattia o condizione, causare la regressione della malattia o condizione, alleviare una condizione causata dalla malattia o condizione, o arrestare i sintomi della malattia o condizione. Il termine “trattare”, “trattando” o “trattamento” comprende, ma senza essere limitato a questi, trattamenti profilattici e/o terapeutici. Il termine “trattare”, “trattando” o “trattamento” può riferirsi alla diminuzione, riduzione o miglioramento di uno o più sintomi associati con cancro della prostata.

Quando usata in questa sede, l’espressione “polimero solubile in acqua” si riferisce a qualsiasi polimero che è solubile in solventi acquosi. Tali polimeri solubili in acqua comprendono, ma senza essere limitati a questi,

polietilenglicole, polietilenglicole propionaldeide, loro derivati mono C₁-C₁₀ alcossilici o arilossilici (descritti nel brevetto U.S. n. 5.252.714), monometossi-polietilenglicole, polivinilpirrolidone, alcool polivinilico, poliamminoacidi, anidride diviniletermaleica, N-(2-idrossipropil)metacrilammide, destrano, derivati di destrano comprendenti destransolfato, polipropilenglicole, copolimero ossido di propilene/ossido di etilene, poliolo poliossietilato, eparina, frammenti di eparina, polisaccaridi, oligosaccaridi, glicani, cellulosa e derivati di cellulosa comprendenti, ma senza essere limitati a queste, metilcellulosa e carbossimetilcellulosa, albumina del siero, amido e derivati di amido, polipeptidi, polialchilenglicole e suoi derivati, copolimeri di polialchilenglicole e loro derivati, poliviniletileteri e alfa-beta-poli[(2-idrossietil)-DL-aspartammide e simili, o loro miscele. Solamente a titolo di esempio, l'accoppiamento di tali polimeri solubili in acqua con polipeptidi di amminoacidi naturali o polipeptidi non naturali può portare a cambiamenti comprendenti, ma senza essere limitati a questi, solubilità in acqua aumentata, semi-vita nel siero aumentata o modulata, semi-vita terapeutica aumentata o modulata rispetto alla forma non modificata, biodisponibilità aumentata, attività biologica modulata, tempo in circolazione prolungato, immunogenicità modulata, caratteristiche di associazione fisica modulate comprendenti, ma senza essere limitate a questi, aggregazione e formazione di un multimerico, legame al recettore alterato, legame alterato a uno o più partner di legame, e dimerizzazione o multimerizzazione del recettore alterata. Inoltre, tali polimeri solubili in acqua possono o meno avere la loro propria attività biologica.

Quando usata in questa sede, l'espressione "semi-vita nel siero modulata" si riferisce a cambiamenti positivi o negativi nella semi-vita in circolazione di una molecola biologicamente attiva modificata rispetto alla sua forma non modificata. A titolo di esempio, le molecole biologicamente attive modificate comprendono, ma senza essere limitate a questi, un amminoacido naturale, un amminoacido non naturale, un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali. A titolo di esempio, la semi-vita nel siero viene misurata prelevando campioni di sangue a vari punti di tempo dopo somministrazione della molecola biologicamente attiva o molecola biologicamente attiva modificata, e determinando la concentrazione di tale molecola in ciascun campione. La correlazione della concentrazione nel siero con il tempo permette il calcolo della semi-vita nel siero. A titolo di esempio, semi-vita nel siero modulata può essere un aumento nella semi-vita nel siero, il quale

può permettere un regime di dosaggio migliorato o evitare effetti tossici. Tali aumenti nel siero possono essere di almeno circa due volte, almeno circa tre volte, almeno circa cinque volte o almeno circa dieci volte. Metodi per la valutazione della semi-vita nel siero sono noti nella tecnica e possono venire usati per valutare la semi-vita nel siero di anticorpi e coniugati farmaco-anticorpo della presente descrizione.

L'espressione "semi-vita terapeutica modulata", quando usata in questa sede, si riferisce a un cambiamento positivo o negativo nella semi-vita della quantità terapeuticamente efficace di una molecola biologicamente attiva modificata, rispetto alla sua forma non modificata. A titolo di esempio, le molecole biologicamente attive modificate comprendono, ma senza essere limitate a questi, un amminoacido naturale, un amminoacido non naturale, un polipeptide di amminoacidi naturali o un polipeptide di amminoacidi non naturali. A titolo di esempio, la semi-vita terapeutica viene misurata misurando le proprietà farmacocinetiche e/o farmacodinamiche della molecola a vari punti di tempo dopo la somministrazione. La semi-vita terapeutica aumentata può permettere un regime di dosaggio vantaggioso particolare, una dose totale vantaggiosa particolare, o evitare un effetto indesiderato. A titolo di esempio, la semi-vita terapeutica aumentata può derivare da potenza aumentata, legame aumentato o diminuito della molecola modificata al suo bersaglio, un aumento o una diminuzione in un altro parametro o meccanismo di azione della molecola non modificata, o una decomposizione aumentata o diminuita delle molecole da parte di enzimi come, solamente a titolo di esempio, proteasi. Metodi per la valutazione della semi-vita terapeutica sono noti nella tecnica e possono venire usati per valutare la semi-vita terapeutica di anticorpi e coniugati farmaco-anticorpo della presente descrizione.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Le nuove caratteristiche dell'invenzione vengono espone con particolarità nelle rivendicazioni allegate. Una comprensione migliore delle caratteristiche e dei vantaggi della presente descrizione dell'invenzione verrà ottenuta mediante riferimento alla seguente descrizione dettagliata che espone realizzazioni illustrative, nelle quali vengono utilizzati i principi dell'invenzione, e ai disegni allegati forniti.

La figura 1 rappresenta gli studi farmacocinetici condotti in topi con coniugati farmaco-anticorpo (ADC) anti-PSMA usando una MMAF non scindibile, una MMAF scindibile corta, una MMAF scindibile e una MMAE

scindibile corta. F1 rappresenta la rilevazione del coniugato farmaco-anticorpo nel siero mediante l'anticorpo. F3 rappresenta la rilevazione del coniugato farmaco-anticorpo nel siero mediante il farmaco-legante.

La figura 2 rappresenta gli studi farmacocinetici condotti in ratti con ADC anti-PSMA, che mostrano MMAF non scindibile a varie concentrazioni.

La figura 3 rappresenta il confronto farmacocinetico di un anticorpo anti-PSMA non coniugato (anticorpo nudo) rispetto ad ADC che usano MMAF non scindibile.

Le figure 4A-4B rappresentano la risposta di una singola dose in un modello di prostata con xenotrapianto C4-2 sulla crescita del tumore (figura 4A) e sul cambiamento del peso corporeo (figura 4B) usando ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile a vari dosaggi.

Le figure 5A-5B rappresentano la risposta di una singola dose in un modello di prostata con xenotrapianto C4-2 sulla crescita del tumore (figura 5A) e sul cambiamento del peso corporeo (figura 5B) usando ADC anti-PSMA con MMAF scindibile corta a vari dosaggi.

Le figure 6A-6B rappresentano gli studi farmacocinetici in topi (figura 6A) e scimmie cinomolgo (figura 6B) portatori di tumore e non portatori dopo una singola dose di ADC anti-PSMA che usa MMAF non scindibile.

Le figure 7A-7B rappresentano la risposta di una dose ripetuta in un modello di prostata con xenotrapianto C4-2 sulla crescita del tumore (figura 7A) e sul cambiamento del peso corporeo (figura 7B) usando ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile e ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile più enzalutammide a vari dosaggi.

Le figure 8A-8B rappresentano la risposta di una dose ripetuta in un modello di prostata PDX sulla crescita del tumore (figura 8A) e sul cambiamento del peso corporeo (figura 8B) usando ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile e ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile più enzalutammide a vari dosaggi.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Prima di descrivere la presente invenzione in dettaglio, occorre comprendere che la presente invenzione non è limitata a metodologie o composizioni o sistemi biologici particolari, i quali possono naturalmente variare.

Occorre anche comprendere che la terminologia usata in questa sede ha solamente lo scopo di descrivere realizzazioni particolari e non è destinata a essere limitativa. Quando usate nella presente descrizione e nelle

rivendicazioni allegate, le forme singolari “un”, “uno” e “il” comprendono i referenti plurali a meno che il contesto imponga chiaramente in modo diverso. Quindi, per esempio, il riferimento a “una cellula” comprende una combinazione di due o più cellule e simili.

Viene inteso che le rivendicazioni seguenti definiscono il campo dell’invenzione e che metodi e strutture entro il campo di queste rivendicazioni sono in tal modo coperti.

Se non altrimenti definiti in questa sede o in seguito nel resto della descrizione, tutti i termini tecnici e scientifici usati in questa sede hanno lo stesso significato comunemente compreso dalle persone di ordinaria esperienza nella tecnica alla quale appartiene l’invenzione.

Prodotti terapeutici a base di anticorpi sono emersi come componenti importanti di terapie per un numero crescente di malignità umane in campi quali oncologia, malattie infiammatorie e infettive. In molti casi, la base della funzione terapeutica consiste nell’alto grado di specificità e affinità che il farmaco a base di anticorpi presenta per il suo antigene bersaglio. La dotazione di anticorpi monoclonali con farmaci, tossine o radionuclidi è ancora un’altra strategia tramite la quale gli anticorpi monoclonali possono indurre un effetto terapeutico. Combinando la squisita specificità di indirizzamento dell’anticorpo con la potenza di uccisione tumorale di molecole effettrici tossiche, gli immunoconiugati permettono una discriminazione sensibile fra tessuto bersaglio e normale, portando in tal modo a meno effetti secondari rispetto a farmaci chemioterapeutici più convenzionali. Le tossine utilizzate possono coniugarsi specificamente, stabilmente e in modo irreversibile a siti unici nell’anticorpo. Questo processo di coniugazione unico consente il controllo preciso della posizione della tossina sull’anticorpo, e anche il numero di tossine coniugate a ciascun anticorpo. Entrambe di queste caratteristiche sono critiche per controllare le caratteristiche biofisiche e le tossicità associate con ADC (vedere, per esempio, Jackson et al., 2014, Tian et al., 2014).

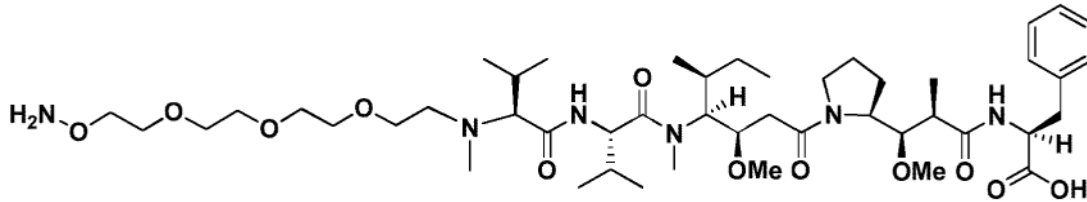
I coniugati farmaco-anticorpo anti-PSMA forniti nella presente descrizione comprendono anticorpi monoclonali umanizzati o chimerici e varianti che si legano al dominio extracellulare dell’antigene prostatico-specifico di membrana. L’antigene prostatico-specifico di membrana è una proteina della membrana tipo II che viene altamente espressa, per esempio, in neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN), cancri della prostata primari e

cancro della prostata metastatici. L'anticorpo anti-PSMA descritto in questa sede può essere qualsiasi anticorpo per PSMA noto con almeno un amminoacido codificato in modo non naturale o innaturalmente.

La presente descrizione fornisce anticorpi anti-PSMA e loro varianti aventi un amminoacido codificato in modo non naturale che facilita la coniugazione dell'anticorpo a un farmaco (per esempio un farmaco, una molecola di tossina). In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo anti-PSMA coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo anti-PSMA coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nella catena pesante dell'anticorpo. In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo anti-PSMA coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nella catena leggera dell'anticorpo. In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo a lunghezza intera coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo. In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo a lunghezza intera coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nella catena pesante dell'anticorpo. In un aspetto, il ADC comprende un anticorpo a lunghezza intera coniugato a un farmaco, in cui la coniugazione avviene tramite un amminoacido codificato in modo non naturale nella catena leggera dell'anticorpo. Nell'invenzione come rivendicata, il coniugato farmaco-anticorpo comprende un anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anticorpo anti-PSMA) coniugato a un farmaco-legante, in cui la coniugazione avviene tramite una para-acetilfenilalanina incorporata nella sequenza della catena pesante, in cui l'anticorpo anti-PSMA comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 8 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9, in cui una para-acetilfenilalanina è incorporata nella posizione A114 della catena pesante secondo lo schema di numerazione di Kabat.

In alcuni aspetti, il farmaco del ADC è un farmaco o agente citotossico. In alcuni aspetti della descrizione, il farmaco citotossico viene scelto nel gruppo consistente in una auristatina, un agente legante il solco minore del DNA, un agente alchilante il solco minore del DNA, una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un tassano, una puomicina, una dolastatina, un maitansinoide e un alcaloide vinca. In alcuni aspetti della

descrizione, il farmaco citotossico è AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina-10, echinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1 o netropsina, ma senza essere limitato a questi. Nell'invenzione come rivendicata, il legante per il farmaco è una monometilauristatina F non scindibile avente la struttura:



In alcuni aspetti della descrizione, il farmaco citotossico è un agente anti-tubulina. In alcuni aspetti, l'agente anti-tubulina è una auristatina, un alcaloide vinca, una podofillotossina, un tassano, un derivato di baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina o una dolastatina. In altri aspetti della descrizione, l'agente antitubulina è AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, eptilone A, eptilone B, nocodazolo, colchicine, colcimid, estramustina, cemadotina, discodennolide, maitansina, DM-1 o eleuterobina, ma senza essere limitato a questi.

In altri aspetti della descrizione, il farmaco citotossico del ADC è gancyclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimo, rapamicina, ciclofosfamide, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato, cortisolo, aldosterone, dexametasone, un inibitore di cicloossigenasi, un inibitore di 5-ipossigenasi o un antagonista del recettore di leucotrieni.

In alcuni aspetti della descrizione, l'anticorpo del ADC comprende un anticorpo a lunghezza intera o un suo frammento che: (a) si lega a PSMA, e (b) viene coniugato a un agente citotossico o un agente immunosoppressivo, in cui il coniugato farmaco-anticorpo esercita: (a) un effetto citotossico o citostatico su una linea di cellule cancerose che esprimono PSMA, o (b) un effetto citotossico, citostatico o immunosoppressivo su una cellula immunitaria che esprime PSMA, in cui la coniugazione avviene in corrispondenza di un amminoacido codificato in modo non naturale nell'anticorpo.

In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un

anticorpo, una variante o una composizione che si legano a un recettore di PSMA. In altri aspetti della presente descrizione, l'anticorpo, la variante o la composizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che si legano alla superficie extracellulare del recettore di PSMA. In un altro aspetto della presente descrizione, l'anticorpo, la variante o la composizione descritti possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che si legano a un dimero di PSMA. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che hanno CDR ottenute da J591 innestate sulla regione strutturale della regione variabile. In altri aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione della presente descrizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che hanno un amminoacido codificato in modo non naturale. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante o la composizione possono essere un anticorpo, una variante o una composizione che vengono descritti mediante più di uno degli aspetti altrove in questa sede la presente descrizione. In alcuni aspetti, l'anticorpo, la variante di anticorpo o la composizione(i) di anticorpo descritti in questa sede possono essere completamente umanizzati. In altri aspetti, l'anticorpo, la variante di anticorpo o la composizione(i) di anticorpo descritti in questa sede possono essere chimerici. In alcuni aspetti della presente descrizione, l'anticorpo può essere un anticorpo che è un anticorpo a lunghezza intera (regioni variabile + Fc), Fab, bispecifico, Fab-dimeri, Fab-bispecifico, Fab-trispecifico, attivatori di cellule T bispecifici, anticorpo di re-indirizzamento ad affinità duplice, anticorpo bispecifico IgG1/IgG3, diabody, diabody bispecifico, scFv-Fc, minibody.

Metodi, composizioni e tecniche per creare e usare derivati o analoghi di un legante di dolastatina comprendenti almeno un carbonile, bicarbonile, ossima, idrossilammina, aldeide, aldeide protetta, chetone, chetone protetto, tioestere, estere, bicarbonile, idrazina, azotidrato, ammidina, immina, diammina, cheto-ammina, cheto-alchino, alchino, cicloalchino o ene-dione sono ben noti a una persona di ordinaria esperienza nella tecnica (vedere, per esempio, WO2013/185117). Metodi, composizioni e tecniche per creare e usare derivati o analoghi di un legante di dolastatina comprendenti almeno un amminoacido non naturale o un amminoacido non naturale modificato con una ossima, ammina aromatica, eterociclo (per esempio indolo, chinossalina, fenazina, pirazolo, triazolo, ecc.) sono anche ben noti al tecnico esperto e descritti, per esempio, in WO2013/185117. Tali derivati di legante

di dolastatina comprendenti amminoacidi non naturali possono contenere una ulteriore funzionalità comprendente, ma senza essere limitata a questi, un polimero; un polimero solubile in acqua; un derivato di polietilenglicole; una seconda proteina o polipeptide o analogo di polipeptide; un anticorpo o frammento di anticorpo; e qualsiasi loro combinazione. Si noti che le varie funzionalità summenzionate non intendono implicare che i membri di una funzionalità non possono venire classificati come membri di un'altra funzionalità. In effetti, vi sarà sovrapposizione a seconda di particolari circostanze. Solamente a titolo di esempio, un polimero solubile in acqua si sovrappone nel campo con un derivato di polietilenglicole, tuttavia la sovrapposizione non è completa e quindi entrambe le funzionalità vengono citate in precedenza.

Viene fornito in questa sede in alcuni aspetti un derivato di legante di gruppo tossico comprendente un carbonile, bicarbonile, ossima, idrossilammina, aldeide, aldeide protetta, chetone, chetone protetto, tioestere, estere, bicarbonile, idrazina, azotidrato, ammidina, immina, diammina, cheto-ammina, cheto-alchino, alchino, cicloalchino o ene-dione. In alcuni aspetti, il derivato di gruppo tossico comprende qualsiasi dei leganti descritti in questa sede. Metodi, composizioni e tecniche per creare e usare derivati o analoghi di gruppo tossico comprendenti almeno un amminoacido non naturale o un amminoacido non naturale modificato con una ossima, ammina aromatica, eterociclo (per esempio indolo, chinossalina, fenazina, pirazolo, triazolo, ecc.) sono descritti in WO2013/185117. In alcuni aspetti, tali derivati tossici comprendenti amminoacidi non naturali possono contenere una ulteriore funzionalità comprendente, ma senza essere limitata a questi, un polimero; un polimero solubile in acqua; un derivato di polietilenglicole; una seconda proteina o polipeptide o analogo di polipeptide; un anticorpo o frammento di anticorpo; e qualsiasi loro combinazione. In aspetti specifici, il gruppo tossico è un inibitore di tubulina. In certi aspetti specifici, il gruppo tossico è dolastatina o auristatina. In altri aspetti specifici, il gruppo tossico è un derivato di dolastatina o auristatina. Si noti che le varie funzionalità summenzionate non intendono implicare che i membri di una funzionalità non possono venire classificati come membri di un'altra funzionalità. In effetti, vi sarà sovrapposizione a seconda di particolari circostanze. Solamente a titolo di esempio, un polimero solubile in acqua si sovrappone nel campo con un derivato di polietilenglicole, tuttavia la sovrapposizione non è completa e quindi entrambe le funzionalità vengono citate in precedenza.

Certi aspetti della presente descrizione descrivono preparazioni di certe parti tossiche con leganti che riducono la tossicità della parte *in vivo* mentre la parte tossica mantiene l'attività farmacologica. In alcuni aspetti, la tossicità del gruppo tossico legato, quando somministrato a un animale o un uomo, viene ridotta o eliminata rispetto al gruppo tossico o derivati del gruppo tossici liberi comprendenti legami labili, pur mantenendo l'attività farmacologica. In alcuni aspetti, dosi aumentate del gruppo tossico legato (per esempio derivati di legante di dolastatina, derivati di dolastatina legati ad amminoacido non naturale) possono venire somministrate ad animali o uomini con maggiore sicurezza. In certi aspetti, i polipeptidi di amminoacidi non naturali legati a una parte tossica (per esempio un derivato di dolastatina) forniscono stabilità *in vitro* e *in vivo*. In alcuni aspetti, i polipeptidi di amminoacidi non naturali legati a una parte tossica (per esempio inibitore di tubulina, derivato di dolastatina-10) sono efficaci e meno tossici rispetto alla parte tossica (per esempio inibitore di tubulina, dolastatina-10) libera.

Metodologia e tecniche

La presente descrizione comprende metodologie e tecnologie ben note nella tecnica. Queste comprendono metodi convenzionali di spettroscopia di massa, NMR, HPLC, chimica delle proteine, biochimica, tecniche di DNA ricombinante e farmacologia, entro l'esperienza della tecnica. I composti della presente descrizione possono venire sintetizzati usando vari procedimenti e schemi impiegati nella tecnica. Vedere, per esempio, Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 855-869, 2002; Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784, 2003; WO2012/166560; WO2013/185117. Molte metodologie e tecniche per la sintesi di composti farmaceutici, diagnostici o terapeutici sono ben note a una persona di ordinaria esperienza nella tecnica.

La presente descrizione, se non altrimenti indicato, comprende anche tecniche convenzionali di biologia molecolare (comprese tecniche ricombinanti), biologia cellulare, biochimica e immunologia, tutte entro l'esperienza della tecnica. Tali tecniche sono completamente spiegate nella letteratura, come *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Terza Edizione, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (Sambrook et al. Eds., 2001); *Oligonucleotide Synthesis: Methods And Applications (Methods in Molecular Biology)*, Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, M. J., Ed.,

1984); *Methods In Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ; *Cell Biology: A Laboratory Notebook*, Academic Press, New York, NY (Cellis, J. E., Ed., 1998); *Animal Cell Culture* (Freshney, R. I., Ed., 1987); *Introduction To Cell And Tissue Culture* Plenum Press, New York, NY, (Mather, J. P. and Roberts, P. E., Eds., 1998); *Cell And Tissue Culture: Laboratory Procedures* John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, (Doyle, A. et al., Eds., 1993-8); *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.) New York, NY; *Weir's Handbook Of Experimental Immunology* Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY, (Herzenberg, L. A. et al. Eds., 1997); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, (Miller, J. M. et al. Eds., 1987); *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Pub. Associates, New York, NY, (Ausubel, F. M. et al., Eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser, Boston, MA, (Mullis, K. et al., Eds., 1994); *Current Protocols In Immunology*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, (Coligan, J. E. et al., eds., 1991); *Short Protocols In Molecular Biology*, Hoboken, NJ, (John Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology 7* Garland Science, Londra, UK, (Janeway, C. A. et al., 2007); *Antibodies*. Stride Publications, Devoran, UK, (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* Oxford University Press, USA, New York, NY, (D. Catty., ed., 1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* Oxford University Press, USA, New York NY, (Shepherd, P. et al. Eds., 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (Harlow, E. et al. Eds., 1998); *The Antibodies* Harwood Academic Publishers, Londra, UK, (Zanetti, M. et al. Eds. 1995).

Derivati di legante di dolastatina

In aspetti della presente descrizione, possono venire utilizzati derivati o analoghi di legante di dolastatina comprendenti almeno un amminoacido non naturale o un amminoacido non naturale modificato con un gruppo carbonile, bicarbonile, ossima o idrossilammina. Metodi per scegliere e progettare un derivato di legante di dolastatina da modificare usando metodi, composizioni e tecniche sono ben noti nella tecnica, vedere per

esempio WO2013/185117. Il derivato di legante di dolastatina può venire progettato *de novo* compreso, solamente a titolo di esempio, come parte di un processo di selezione ad alta produttività (nel qual caso possono venire progettati, sintetizzati, caratterizzati e/o testati numerosi polipeptidi) o in base agli interessi del ricercatore. Il nuovo derivato di legante di dolastatina può anche venire progettato in base alla struttura di un polipeptide noto o parzialmente caratterizzato. I principi per scegliere quale amminoacido(i) sostituire e/o modificare e la scelta di quale modifica impiegare sono descritti, per esempio, in WO2013/185117. Il derivato di legante di dolastatina può venire progettato per soddisfare le necessità dello sperimentatore o dell'utilizzatore finale. Tali necessità possono comprendere, ma senza essere limitate a queste, manipolazione dell'efficacia terapeutica del polipeptide, miglioramento del profilo di sicurezza del polipeptide, regolazione delle farmacocinetiche, farmacologie e/o farmacodinamiche del polipeptide come, solamente a titolo di esempio, l'aumento della solubilità in acqua, biodisponibilità, aumento della semi-vita nel siero, aumento della semi-vita terapeutica, modulazione dell'immunogenicità, modulazione dell'attività biologica o prolungamento del tempo in circolazione. Inoltre, tali modifiche comprendono, solamente a titolo di esempio, il fornire una funzionalità addizionale al polipeptide, incorporare un anticorpo e qualsiasi combinazione delle modifiche summenzionate. Tali derivati di legante di dolastatina possono venire modificati per contenere un gruppo ossima, carbonile, bicarbonile o idrossilammina. Il derivato di legante di dolastatina può contenere almeno uno, almeno due, almeno tre, almeno quattro, almeno cinque, almeno sei, almeno sette, almeno otto, almeno nove, o dieci o più di un gruppo carbonile o bicarbonile, gruppo ossima, gruppo idrossilammina o loro forme protette. Il derivato di legante di dolastatina può essere uguale o diverso, per esempio vi possono essere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più siti diversi nel derivato che comprendono 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più gruppi reattivi diversi.

Per esempio, derivati di dolastatina con leganti contenenti un gruppo idrossilammina (anche denominato un amminossi) permettono la reazione con una varietà di gruppi elettrofili per formare coniugati compresi, ma senza essere limitati a questi, con PEG o altri polimeri solubili in acqua. Come le idrazine, idrazidi e semicarbazidi, la nucleofilicità potenziata del gruppo amminossi gli permette di reagire efficacemente e selettivamente con una

varietà di molecole che contengono gruppi carbonile o bicarbonile comprendenti, ma senza essere limitati a questi, chetoni, aldeidi o altri gruppi funzionali con reattività chimica simile (vedere, per esempio, Shao, J. e Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899, 1995; H. Hang e C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34(9): 727-736, 2001). Mentre il risultato della reazione con un gruppo idrazina è l'idrazone corrispondente, una ossima tuttavia deriva generalmente dalla reazione di un gruppo amminoossi con un gruppo contenente carbonile o bicarbonile come, a titolo di esempio, chetoni, aldeidi o altri gruppi funzionali con reattività chimica simile. In alcuni aspetti, derivati di dolastatina con leganti comprendenti una azide, un alchino o un cicloalchino consentono il legame di molecole tramite reazioni di cicloaddizione (per esempio cicloaddizioni 1,3-dipolari, cicloaddizione di azotidrato-alchino di Huisgen, ecc., descritte nel brevetto U.S. n. 7.807.619).

Quindi, in certi aspetti descritti in questa sede, vi sono derivati di dolastatina con leganti comprendenti un gruppo idrossilammina, aldeide, aldeide protetta, chetone, chetone protetto, tioestere, estere, bicarbonile, idrazina, ammidina, immina, diammina, cheto-ammina, cheto-alchino ed ene-dione idrossilammina, un gruppo tipo idrossilammina (che ha reattività simile a un gruppo idrossilammina ed è strutturalmente simile a un gruppo idrossilammina), un gruppo idrossilammina mascherato (che può venire facilmente convertito in un gruppo idrossilammina), o un gruppo idrossilammina protetto (che ha reattività simile a un gruppo idrossilammina in seguito a deprotezione). In alcuni aspetti, i derivati di dolastatina con leganti comprendono azotidrati, alchini o cicloalchini. Esempi di tali derivati di legante di dolastatina sono inclusi altrove in questa sede e in WO2013/185117 e WO2005/074650.

Amminoacidi non naturali

La scelta del sito dell'amminoacido codificato in modo non naturale era basata su esposizione superficiale/accessibilità del sito entro l'anticorpo, e siti di amminoacido idrofobi o neutri sono stati scelti per mantenere la carica sull'anticorpo. Metodi per introdurre amminoacidi non naturali inseriti in siti in una proteina sono descritti, per esempio, in WO2010/011735 e WO2005/074650. La presente invenzione impiega tali metodologie e tecniche. Gli amminoacidi non naturali usati nei metodi e nelle composizioni descritti in questa sede hanno almeno una delle seguenti quattro proprietà: (1) almeno un gruppo funzionale sulla catena laterale

dell'amminoacido non naturale ha almeno una caratteristica e/o attività e/o reattività ortogonale alla reattività chimica dei 20 amminoacidi comuni codificati geneticamente (cioè alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, cisteina, glutammina, acido glutammico, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina), o almeno ortogonale alla reattività chimica degli amminoacidi presenti in natura presenti nel polipeptide che comprende l'amminoacido non naturale; (2) gli amminoacidi non naturali introdotti sono sostanzialmente chimicamente inerti verso i 20 amminoacidi comuni codificati geneticamente; (3) l'amminoacido non naturale può venire incorporato stabilmente in un polipeptide, preferibilmente con la stabilità commensurata con gli amminoacidi presenti in natura o in condizioni fisiologiche tipiche, e in modo ulteriormente preferibile tale incorporazione può avvenire tramite un sistema *in vivo*; e (4) l'amminoacido non naturale comprende un gruppo funzionale di ossima o un gruppo funzionale che può venire trasformato in un gruppo ossima mediante reazione con un reagente, preferibilmente in condizioni che non distruggono le proprietà biologiche del polipeptide che comprende l'amminoacido non naturale (a meno che naturalmente tale distruzione delle proprietà biologiche sia lo scopo della modifica/trasformazione), o in cui la trasformazione può avvenire in condizioni acquose a un pH fra circa 4 e circa 8, o in cui il sito reattivo sull'amminoacido non naturale è un sito elettrofilo. Qualsiasi numero di amminoacidi non naturali può venire introdotto nel polipeptide. Amminoacidi non naturali possono anche includere ossime protette o mascherate o gruppi protetti o mascherati che possono venire trasformati in un gruppo ossima dopo deprotezione del gruppo protetto o smascheramento del gruppo mascherato. Amminoacidi non naturali possono anche includere gruppi carbonile o bicarbonile protetti o mascherati, i quali possono venire trasformati in un gruppo carbonile o bicarbonile dopo deprotezione del gruppo protetto o smascheramento del gruppo mascherato, e sono quindi disponibili per reagire con idrossilammine od ossime per formare gruppi ossima. Amminoacidi non naturali a base di ossima possono venire sintetizzati mediante metodi ben noti nella tecnica (vedere, per esempio, WO2013/185117 e WO2005/074650), comprendenti: (a) reazione di un amminoacido non naturale contenente idrossilammina con un reagente contenente carbonile o bicarbonile; (b) reazione di un amminoacido non naturale contenente carbonile o bicarbonile con un reagente contenente idrossilammina; o (c) reazione di un

amminoacido non naturale contenente ossima con certi reagenti contenenti carbonile o bicarbonile.

Amminoacidi non naturali che possono venire usati nei metodi e nelle composizioni descritti in questa sede comprendono, ma senza essere limitati a questi, amminoacidi comprendenti amminoacidi con gruppi funzionali nuovi, amminoacidi che interagiscono covalentemente o non covalentemente con altre molecole, amminoacidi glicosilati come una serina sostituita con zucchero, altri amminoacidi modificati con carboidrato, amminoacidi contenenti cheto, amminoacidi contenenti aldeide, amminoacidi comprendenti polietilenglicole o altri polieteri, amminoacidi sostituiti con un atomo pesante, amminoacidi chimicamente scindibili e/o fotoscindibili, amminoacidi con una catena laterale allungata rispetto ad amminoacidi naturali comprendenti, ma senza essere limitati a questi, polieteri o idrocarburi a catena lunga comprendente, ma senza essere limitata a questi, maggiore di circa 5 o maggiore di circa 10 atomi di carbonio, amminoacidi contenenti zucchero legato a carbonio, amminoacidi redox-attivi, amminoacidi contenenti amminotioacido e amminoacidi comprendenti una o più parti tossiche.

In alcuni aspetti, amminoacidi non naturali comprendono una parte di saccaride. Esempi di tali amminoacidi comprendono *N*-acetil-L-glucosamminil-L-serina, *N*-acetil-L-galattosamminil-L-serina, *N*-acetil-L-glucosamminil-L-treonina, *N*-acetil-L-glucosamminil-L-asparagina e *O*-mannosamminil-L-serina. Esempi di tali amminoacidi comprendono anche esempi in cui il legame in N o O presente in natura fra l'amminoacido e il saccaride viene sostituito da un legame covalente che non si trova comunemente in natura - comprendente, ma senza essere limitato a questi, un alchene, una ossima, un tioetere, una ammido e simili. Esempi di tali amminoacidi comprendono anche saccaridi che non si trovano comunemente in proteine presenti in natura come 2-deossi-glucosio, 2-deossalattosio e simili.

Le parti chimiche incorporate in polipeptidi tramite l'incorporazione di amminoacidi non naturali in tali polipeptidi offrono una varietà di vantaggi e manipolazioni di polipeptidi. Per esempio, la reattività unica di un gruppo funzionale carbonile o bicarbonile (comprendente un gruppo funzionale cheto o aldeide) permette la modifica selettiva di proteine con qualsiasi di un certo numero di reagenti contenenti idrazina o idrossilammina *in vivo* e *in vitro*. Un amminoacido non naturale con un atomo pesante può per esempio essere utile per la messa

in fase dei dati di una struttura a raggi x. L'introduzione sito-specifica di atomi pesanti usando amminoacidi non naturali fornisce anche selettività e flessibilità nel scegliere posizioni per atomi pesanti. Amminoacidi non naturali fotoreattivi (comprendenti, ma senza essere limitati a questi, amminoacidi con benzofenone e arilazidi (comprendenti, ma senza essere limitate a queste, catene laterali di fenilazide) permettono per esempio una fotoreticolazione di polipeptidi *in vivo* e *in vitro* efficiente. Esempi di amminoacidi non naturali fotoreattivi comprendono, ma senza essere limitati a queste, p-azido-fenilalanina e p-benzoil-fenilalanina. Il polipeptide con gli amminoacidi non naturali fotoreattivi può quindi venire reticolato a piacere tramite eccitazione del gruppo fotoreattivo che fornisce un controllo temporale. In un esempio non limitativo, il gruppo metile di un ammino non naturale può venire sostituito con uno isotopicamente marcato comprendente, ma senza essere limitato a questo, con un gruppo metile, come una sonda della struttura locale e delle dinamiche compreso, ma senza essere limitato a questo, con l'uso di risonanza magnetica nucleare e spettroscopia vibrazionale.

Derivati di dolastatina legati ad amminoacido non naturale

In altri aspetti della presente descrizione descritta in questa sede, vi sono metodi, strategie e tecniche per l'incorporazione di almeno un derivato di legante di dolastatina in un amminoacido non naturale. La presente descrizione descritta in questa sede comprende metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare derivati di legante di dolastatina contenenti almeno un tale amminoacido non naturale. Vengono anche inclusi in questo aspetto composizioni di e metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare oligonucleotidi (comprendenti DNA e RNA) che possono venire usati per produrre, almeno in parte, un derivato di legante di dolastatina contenente almeno un amminoacido non naturale. Vengono anche inclusi in questo aspetto composizioni di e metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare cellule che possono esprimere tali oligonucleotidi che possono venire usati per produrre, almeno in parte, un derivato di legante di dolastatina contenente almeno un amminoacido non naturale.

Quindi, vengono forniti e descritti in questa sede derivati di legante di dolastatina comprendenti almeno un amminoacido non naturale o un amminoacido non naturale modificato con un gruppo carbonile, bicarbonile, alchino, cicloalchino, azotidrato, ossima o idrossilammina. In certi aspetti, derivati di legante di dolastatina con

almeno un amminoacido non naturale o un amminoacido non naturale modificato con un gruppo carbonile, bicarbonile, alchino, cicloalchino, azotidrato, ossima o idrossilammina comprendono almeno una modifica post-traslazionale in una certa posizione sul polipeptide. In alcuni aspetti, la modifica co-traslazionale o post-traslazionale avviene tramite il macchinario cellulare (per esempio glicosilazione, acetilazione, acilazione, modifica con lipide, palmitoilazione, aggiunta di palmitato, fosforilazione, modifica del legame con glicolipide e simili), in molti casi tali modifiche co-traslazionali o post-traslazionali basati sul macchinario cellulare si verificano in corrispondenza di siti dell'amminoacido presente in natura sul polipeptide, tuttavia in certi aspetti le modifiche co-traslazionali o post-traslazionali basate sul macchinario cellulare si verificano sul sito(i) dell'amminoacido non naturale sul polipeptide.

In altri aspetti, le modifiche post-traslazionali non utilizzano il macchinario cellulare, ma la funzionalità viene piuttosto fornita mediante attacco di una molecola (un polimero; un polimero solubile in acqua; un derivato di polietilenglicole; una seconda proteina o polipeptide o analogo di polipeptide; un anticorpo o frammento di anticorpo; e qualsiasi loro combinazione) comprendente un secondo gruppo reattivo all' almeno un amminoacido non naturale comprendente un primo gruppo reattivo (comprendente, ma senza essere limitato a questo, un amminoacido non naturale contenente un gruppo funzionale di chetone, aldeide, acetale, emiacetale, alchino, cicloalchino, azotidrato, ossima o idrossilammina) utilizzando metodologia di chimica descritta in questa sede, o altre adatte per i particolari gruppi reattivi. In certi aspetti, la modifica co-traslazionale o post-traslazionale viene effettuata *in vivo* in una cellula eucariotica o in una cellula non eucariotica. In certi aspetti, la modifica post-traslazionale viene effettuata *in vitro* senza utilizzare il macchinario cellulare. Anche inclusi con questo aspetto sono metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare tali derivati di legante di dolastatina contenenti almeno uno di tali amminoacidi non naturali modificati co-traslazionalmente o post-traslazionalmente.

Anche inclusi entro il campo dei metodi, composizioni, strategie e tecniche descritto in questa sede sono reagenti in grado di reagire con un derivato di legante di dolastatina (contenente un gruppo carbonile o bicarbonile, un gruppo ossima, alchino, cicloalchino, azotidrato, un gruppo idrossilammina o loro forme mascherate o protette) che fa parte di un polipeptide così da produrre qualsiasi delle modifiche post-traslazionali summenzionate. In

certi aspetti, il derivato di legante di dolastatina modificato post-traslazionalmente risultante conterrà almeno un gruppo ossima; il derivato di legante di dolastatina contenente ossima modificato risultante può subire reazioni di modifica successive. Anche inclusi con questo aspetto sono metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare tali reagenti che sono in grado di qualsiasi di tali modifiche post-traslazionali di tale derivato(i) di legante di dolastatina.

In certi aspetti, il polipeptide o derivato di dolastatina legato ad amminoacido non naturale comprende almeno una modifica co-traslazionale o post-traslazionale che viene effettuata *in vivo* mediante una cellula ospite, in cui la modifica post-traslazionale non viene normalmente effettuata da un altro tipo di cellula ospite. In certi aspetti, il polipeptide comprende almeno una modifica co-traslazionale o post-traslazionale che viene effettuata *in vivo* mediante una cellula eucariotica, in cui la modifica co-traslazionale o post-traslazionale non viene normalmente effettuata mediante una cellula non eucariotica. Esempi di modifiche co-traslazionali o post-traslazionali comprendono, ma senza essere limitate a queste, glicosilazione, acetilazione, acilazione, modifica con lipide, palmitoilazione, aggiunta di palmitato, fosforilazione, modifica del legame con glicolipide e simili. In un aspetto, la modifica co-traslazionale o post-traslazionale comprende l'attacco di un oligosaccaride a una asparagina mediante un legame di GlcNAc-asparagina (compreso, ma senza essere limitato a questo, quando l'oligosaccaride comprende (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc e simili). In un altro aspetto, la modifica co-traslazionale o post-traslazionale comprende l'attacco di un oligosaccaride (comprendente, ma senza essere limitato a questi, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, ecc.) a una serina o treonina tramite un legame di GalNAc-serina, uno GalNAc-treonina, uno GlcNAc-serina o uno GlcNAc-treonina. In certi aspetti, una proteina o polipeptide può comprendere una sequenza di secrezione o localizzazione, un marcatore di epitopo, un marcatore FLAG, un marcatore di poliistidina, una fusione GST e/o simili. Anche inclusi con questo aspetto sono metodi per produrre, purificare, caratterizzare e usare tali polipeptidi contenenti almeno una tale modifica co-traslazionale o post-traslazionale. In altri aspetti, il polipeptide di amminoacidi non naturali glicosilati viene prodotto in una forma non glicosilata. Tale forma non glicosilata di un amminoacido non naturale glicosilato può venire prodotta mediante metodi che comprendono rimozione chimica o enzimatica di gruppi di polisaccaride da un polipeptide

di amminoacidi non naturali glicosilati isolato o sostanzialmente purificato o non purificato; la produzione dell'amminoacido non naturale in un ospite che non glicosila tale polipeptide di amminoacidi non naturali (come un ospite comprendente procarioti o eucarioti ingegnerizzati o mutati per non glicosilare tale polipeptide), l'introduzione di un inibitore di glicosilazione nel terreno di coltura cellulare nel quale tale polipeptide di amminoacidi non naturali viene prodotto mediante un eucariota che normalmente potrebbe glicosilare tale polipeptide, o una combinazione di qualsiasi di tali metodi. Vengono anche descritte in questa sede tali forme non glicosilate di polipeptidi di amminoacidi non naturali normalmente glicosilati (con normalmente glicosilati si intende un polipeptide che potrebbe essere glicosilato quando prodotto in condizioni in cui i polipeptidi presenti in natura vengono glicosilati). Naturalmente, tali forme non glicosilate di polipeptidi di amminoacidi non naturali normalmente glicosilati (o in effetti qualsiasi polipeptide descritto in questa sede) possono essere in una forma non purificata, una forma sostanzialmente purificata o in una forma isolata.

Derivati di dolastatina legati contenenti ossima

Derivati di dolastatina con amminoacido non naturale legati contenenti un gruppo ossima consentono la reazione con una varietà di reagenti che contengono certi gruppi carbonile o bicarbonile reattivi (comprendenti, ma senza essere limitati a questi, chetoni, aldeidi o altri gruppi con reattività simile) per formare nuovi amminoacidi non naturali comprendenti un nuovo gruppo ossima. Tale reazione di scambio dell'ossima permette l'ulteriore funzionalizzazione di derivati di dolastatina legati. Inoltre, il derivato di dolastatina legato originale contenente un gruppo ossima può essere utile di per sé purché il legame ossima sia stabile in condizioni necessarie per incorporare l'amminoacido in un polipeptide (per esempio i metodi di sintesi *in vivo*, *in vitro* e chimici descritti in questa sede e in WO2013/185117 e WO2005/074650).

Quindi, in certi aspetti descritti in questa sede, vi sono derivati di dolastatina con amminoacido non naturale legati con catene laterali comprendenti un gruppo ossima, un gruppo tipo ossima (che ha reattività simile a un gruppo ossima ed è strutturalmente simile a un gruppo ossima), un gruppo ossima mascherato (che può venire facilmente convertito in un gruppo ossima) o un gruppo ossima protetto (che ha reattività simile a un gruppo ossima in seguito a deprotezione).

I metodi e le composizioni per l'incorporazione di uno o più amminoacidi non naturali in un derivato di legante di dolastatina sono ben noti nella tecnica (vedere, per esempio, WO2013/185117 e WO2005/074650). Uno o più amminoacidi non naturali possono venire incorporati in corrispondenza di una o più posizioni particolari che non distruggono l'attività del derivato di legante di dolastatina. Questo può venire ottenuto effettuando sostituzioni "conservative" compreso, ma senza essere limitato a questo, sostituendo amminoacidi idrofobi con amminoacidi idrofobi non naturali o naturali, amminoacidi voluminosi con amminoacidi voluminosi non naturali o naturali, amminoacidi idrofili con amminoacidi idrofili non naturali o naturali) e/o inserendo l'amminoacido non naturale in una posizione che non è richiesta per l'attività.

Una varietà di approcci biochimici e strutturali può venire impiegata per scegliere i siti desiderati per la sostituzione con un amminoacido non naturale entro il derivato di legante di dolastatina. In alcuni aspetti, l'amminoacido non naturale viene legato al C terminale del derivato di dolastatina. In altri aspetti, l'amminoacido non naturale viene legato al N terminale del derivato di dolastatina. Qualsiasi posizione del derivato di legante di dolastatina è adatta per la scelta per incorporare un amminoacido non naturale, e la scelta può essere basata sul progetto razionale o mediante scelta casuale per qualsiasi o nessun particolare scopo desiderato. La scelta di siti desiderati può essere basata sulla produzione di un polipeptide di amminoacidi non naturali (che può venire ulteriormente modificato o rimanere non modificato) avente qualsiasi proprietà o attività desiderata comprendente, ma senza essere limitata a questi, modulatori di legame del recettore, modulatori dell'attività del recettore, modulatori del legame a partner di legame, modulatori dell'attività di partner di legame, modulatori della conformazione di partner di legame, formazione di dimeri o multimeri, nessun cambiamento all'attività o proprietà rispetto alla molecola nativa, o manipolazione di qualsiasi proprietà fisica o chimica del polipeptide come solubilità, aggregazione o stabilità. In alternativa, i siti identificati come critici per l'attività biologica possono anche essere buoni candidati per la sostituzione con un amminoacido non naturale, nuovamente a seconda dell'attività desiderata ricercata per il polipeptide. Un'altra alternativa potrebbe essere semplicemente effettuare sostituzioni seriali in ciascuna posizione sulla catena del polipeptide con un amminoacido non naturale e osservare l'effetto sull'attività del polipeptide. Qualsiasi mezzo, tecnica o metodo

per scegliere una posizione per la sostituzione con un amminoacido non naturale in qualsiasi polipeptide è adatto per l'uso nei metodi, tecniche e composizioni descritti in questa sede.

La struttura e l'attività di mutanti presenti in natura di un polipeptide che contengono delezioni possono anche venire esaminate per determinare le regioni della proteina che probabilmente sono tolleranti alla sostituzione con un amminoacido non naturale. Quando i residui che probabilmente sono intolleranti alla sostituzione con amminoacidi non naturali sono stati eliminati, l'impatto delle sostituzioni proposte in corrispondenza di ciascuna delle posizioni rimanenti può venire esaminato usando metodi comprendenti, ma senza essere limitati a questa, la struttura tridimensionale del polipeptide pertinente e di qualsiasi di ligandi o proteine di legame associati. Le strutture cristallografiche ai raggi X e NMR di molti polipeptidi sono disponibili nel Protein Data Bank (PDB, vedere il world wide web per rcsb.org), un database centralizzato contenente dati strutturali tridimensionali di molecole grandi di proteine e acidi nucleici, possono venire usate per identificare posizioni amminoacidiche che possono venire sostituite con amminoacidi non naturali. Inoltre, possono venire realizzati modelli studiando la struttura secondaria e terziaria di polipeptidi, se non sono disponibili i dati strutturali tridimensionali. Quindi, l'identità di posizioni amminoacidiche che possono venire sostituite con amminoacidi non naturali possono venire facilmente ottenute.

Siti esemplificativi di incorporazione di un amminoacido non naturale comprendono, ma senza essere limitati a questi, quelli che sono esclusi da potenziali regioni di legame per il recettore, o regioni per il legame a proteine leganti o ligandi possono essere completamente o parzialmente esposte a un solvente, hanno interazioni di legame idrogeno minime o assenti con i residui circostanti, possono venire minimamente esposte a residui reattivi circostanti e/o possono essere in regioni che sono altamente flessibili come previsto mediante la struttura cristallina tridimensionale di un particolare polipeptide con il recettore, ligando o proteine leganti dello stesso associati.

Una ampia varietà di amminoacidi non naturali può venire sostituita per, o incorporata in, una data posizione in un polipeptide. A titolo di esempio, un amminoacido non naturale particolare può venire scelto per l'incorporazione in base a un esame della struttura del cristallo tridimensionale di un polipeptide con il ligando,

recettore e/o proteine leganti dello stesso associati, una preferenza per sostituzioni conservative.

In un aspetto, i metodi descritti in questa sede comprendono l'incorporazione nel derivato di legante di dolastatina, in cui il derivato di legante di dolastatina comprende un primo gruppo reattivo; e il contatto del derivato di legante di dolastatina con una molecola (comprendente, ma senza essere limitata a questi, una seconda proteina o polipeptide o analogo di polipeptide; un anticorpo o frammento di anticorpo; e qualsiasi loro combinazione) che comprende un secondo gruppo reattivo. In certi aspetti, il primo gruppo reattivo è una parte di idrossilammina e il secondo gruppo reattivo è una parte di carbonile o bicarbonile, per cui viene formato un legame di ossima. In certi aspetti, il primo gruppo reattivo è una parte di carbonile o bicarbonile e il secondo gruppo reattivo è una parte di idrossilammina, per cui viene formato un legame di ossima. In certi aspetti, il primo gruppo reattivo è una parte di carbonile o bicarbonile e il secondo gruppo reattivo è una parte di ossima, per cui si verifica una reazione di scambio dell'ossima. In certi aspetti, il primo gruppo reattivo è una parte di ossima e il secondo gruppo reattivo è una parte di carbonile o bicarbonile, per cui si verifica una reazione di scambio dell'ossima.

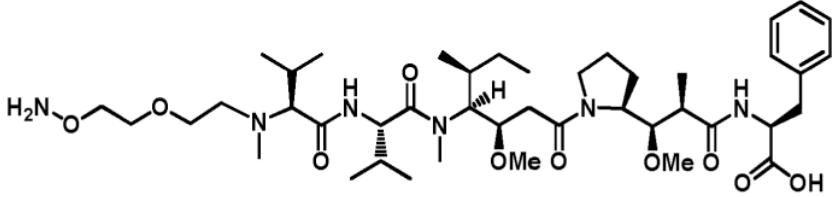
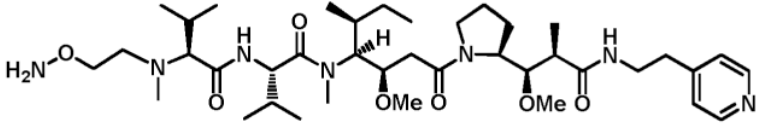
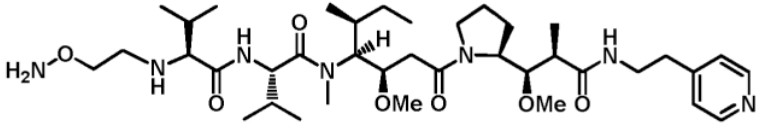
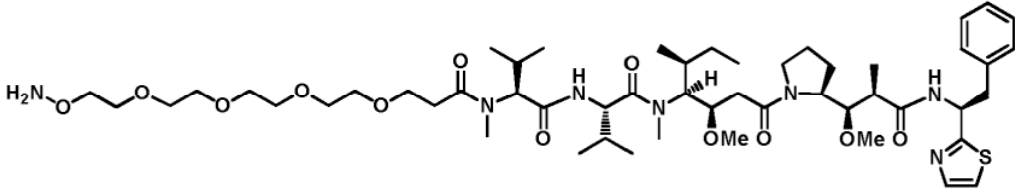
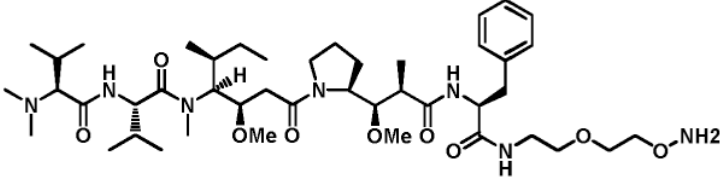
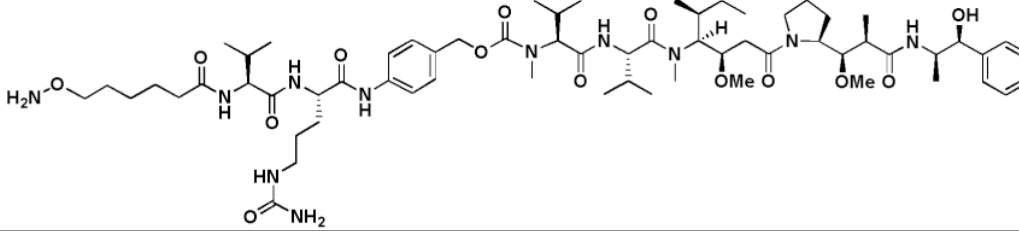
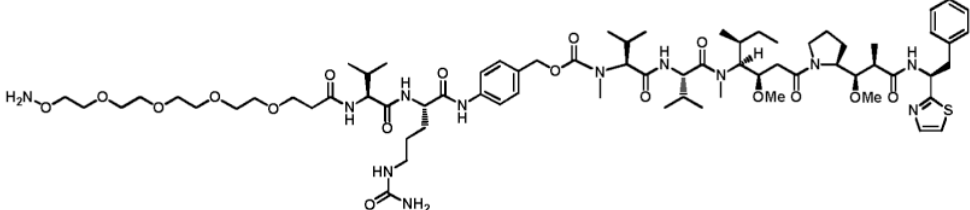
In alcuni casi, l'incorporazione(i) del derivato di legante di dolastatina verrà combinata con altre addizioni, sostituzioni o delezioni entro il polipeptide per influenzare altri tratti chimici, fisici, farmacologici e/o biologici. In alcuni casi, le altre addizioni, sostituzioni o delezioni possono aumentare la stabilità (comprendente, ma senza essere limitata a questa, resistenza alla degradazione proteolitica) del polipeptide o aumentare l'affinità del polipeptide per il recettore, ligando e/o proteine leganti dello stesso appropriati. In alcuni casi, le altre addizioni, sostituzioni o delezioni possono aumentare la solubilità (compreso, ma senza essere limitato a questo, quando espresso in *E. coli* o altre cellule ospiti) del polipeptide. In alcuni aspetti, siti vengono scelti per la sostituzione con un amminoacido codificato naturalmente o non naturale in aggiunta a un altro sito per l'incorporazione di un amminoacido non naturale allo scopo di aumentare la solubilità del polipeptide dopo espressione in *E. coli*, o altre cellule ospiti ricombinanti. In alcuni aspetti, i polipeptidi comprendono un'altra addizione, sostituzione o delezione che modula l'affinità per il ligando, proteine leganti e/o recettore dello stesso associati, modula (compresi, ma senza essere limitati a questi, aumenta o diminuisce) la dimerizzazione del recettore, stabilizza i

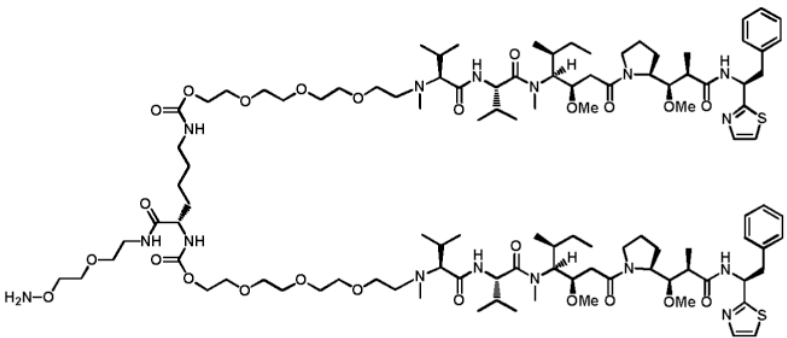
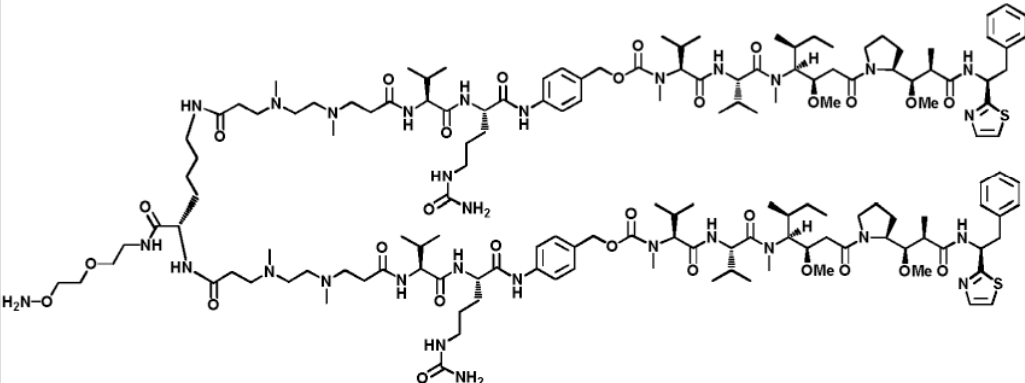
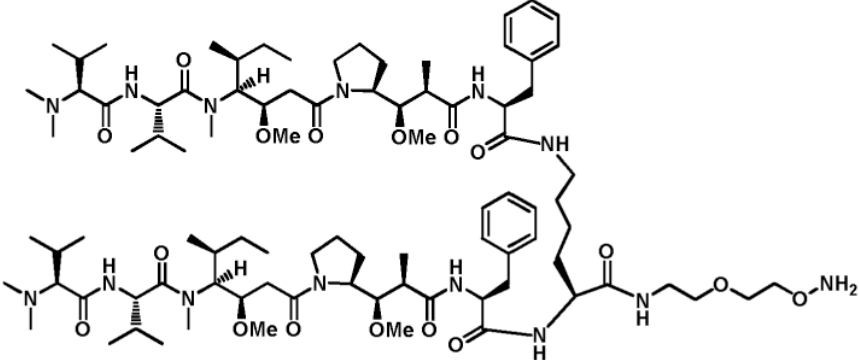
dimeri del recettore, modula la semi-vita in circolazione, modula il rilascio o la biodisponibilità, facilita la purificazione o migliora o altera una particolare via di somministrazione. Analogamente, il polipeptide di amminoacidi non naturali può comprendere sequenze di scissione chimica o enzimatica, sequenze di scissione con proteasi, gruppi reattivi, domini di legame per l'anticorpo (comprendenti, ma senza essere limitati a questi, FLAG o poli-His) o altre sequenze basate su affinità (comprendenti, ma senza essere limitate a questi, FLAG, poli-His, GST, ecc.) o molecole legate (comprendenti, ma senza essere limitate a questa, biotina) che migliorano la rilevazione (comprendente, ma senza essere limitata a questa, GFP), purificazione, trasporto attraverso tessuti o membrane cellulari, rilascio o attivazione di profarmaco, riduzione della dimensione o altri tratti del polipeptide.

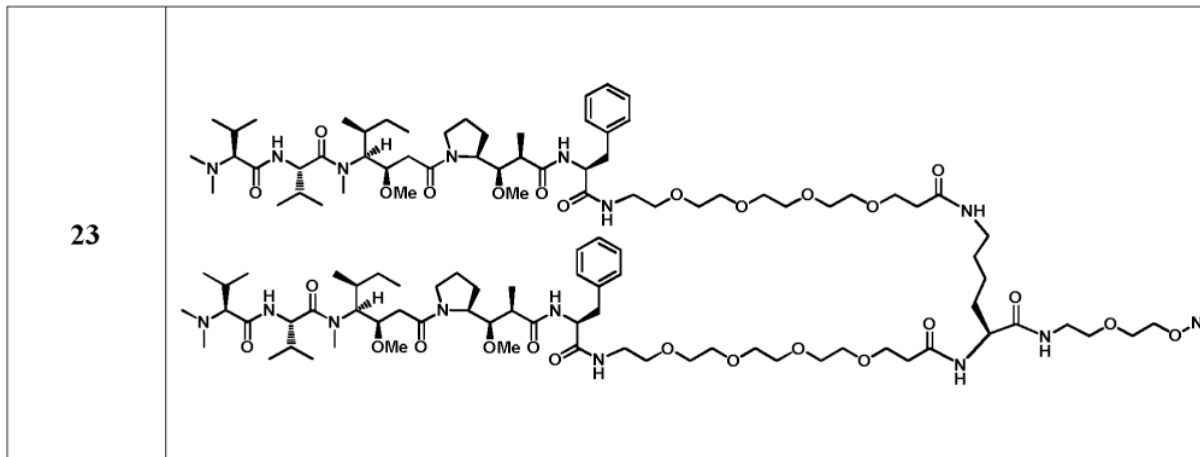
In alcuni aspetti, una parte di carico utile o tossina viene impiegata nei coniugati farmaco-anticorpo anti-PSMA della presente descrizione. Esempi di carichi utili possono comprendere in un modo non limitativo: inibitori di replicazione del DNA, inibitori di trascrizione del DNA, inibitori di traduzione del RNA, inibitori della divisione cellulare, inibitori della segnalazione cellulare, inibitori di chinasi, inibitori di tubulina polimerasi, agenti di depolimerizzazione della tubulina, agenti di scissione del DNA, agenti leganti DNA, inibitori di RNA polimerasi, auristatine, dolastatine, MMAF, MMAE, MMAD, analoghi di duocarmicina, analoghi di pirrolobenzodiazepina (PBD), analoghi di tubulisina, analoghi di maitansina, analoghi di amanitina, analoghi di criptoficina, analoghi di epotilone, analoghi di calicheamicina, analoghi di doxorubicina, analoghi di camptotecina.

In altri aspetti della presente descrizione vengono forniti leganti di un carico utile di farmaco. Inibitori anti-tubulina sono stati scelti come il carico utile in combinazione con leganti scindibili, scindibili corti e non scindibili. In un modo esemplificativo, la combinazione di legante di un carico utile della presente descrizione può comprendere, ma senza essere limitata a questi, leganti di un carico utile scindibili, non scindibili, scindibili corti. Leganti di un carico utile scindibili possono comprendere dipeptidi scindibili (comprendenti, ma senza essere limitati a questi, Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys e Ala-Ala), legame di idrazina, legame disolfuro o legame di pirofosfato. Un esempio di leganti di un carico utile impiegati nel coniugato farmaco-anticorpo anti-PSMA della

La tabella 1 fornisce composti di farmaco-leganti che possono venire impiegati con l'anticorpo anti-PSMA o i coniugati farmaco-anticorpo della presente descrizione. La sintesi di tali leganti di un carico utile è ben nota al tecnico esperto. Vedere, per esempio, Vedere, per esempio, Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 855-869, (2002); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784, (2003); WO2012/166560; WO2013/185117.

8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	

20	
21	
22	

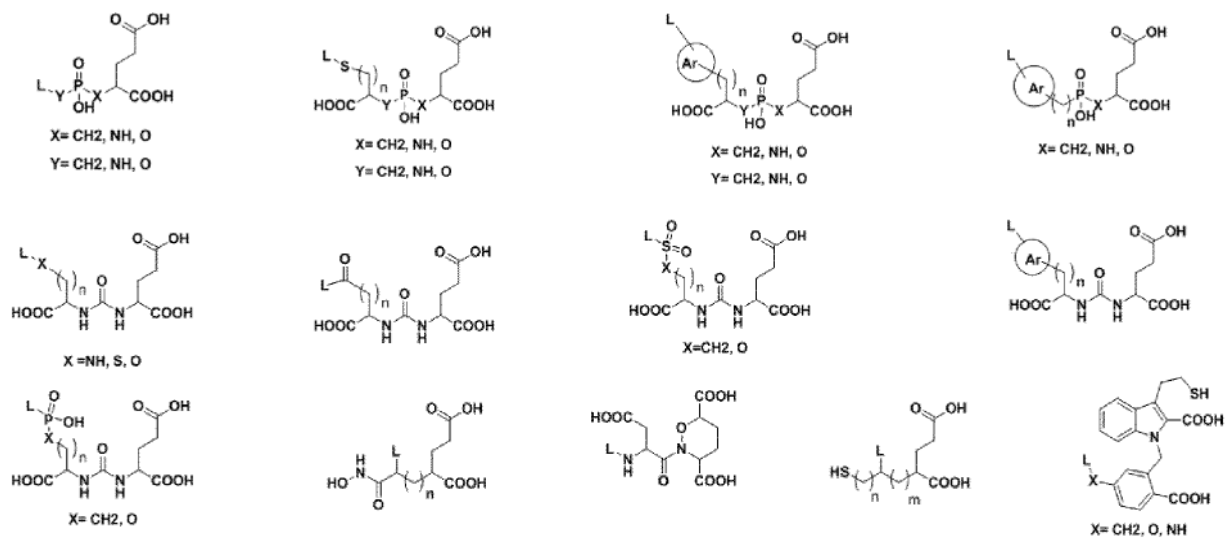


Generazione di ADC anti-PSMA coniugato con ligando di indirizzamento a PSMA

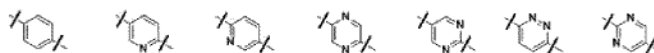
In altri aspetti della descrizione, vengono inclusi ligandi di indirizzamento. Tali ligandi comprendono quelli che si legano al sito attivo del recettore di PSMA, ligandi che sono inibitori dell'attività enzimatica di glutammato carbossipeptidasi del recettore di PSMA, e ligandi usati per la formazione di immagini. La descrizione comprende anche quei ligandi con un intervallo di affinità di legame da sub-pico fino a sub-nanomolare.

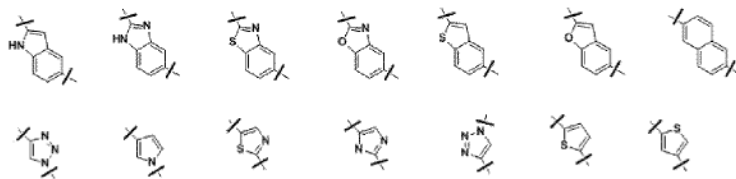
ADC anti-PSMA coniugati con un ligando di indirizzamento a PSMA possono venire generati come descritto in questa sede. Un metodo di generazione comporta coniugazione sequenziale, in cui la tossina-legante viene coniugata all'anticorpo tramite un metodo di coniugazione con cisteina-maleimmide, facendo seguire coniugazione del ligando di indirizzamento a PSMA in corrispondenza di siti specifici sull'anticorpo in base al metodo di ligazione con ossima proprietario. La coniugazione con maleimmide viene eseguita mediante riduzione dei ponti disolfuro fra le catene pesante e leggera dell'anticorpo facilitata dall'aggiunta di agenti riducenti pertinenti. I legami disolfuro dell'anticorpo possono venire ridotti incubando una miscela di reazione formulata in un pH nell'intervallo da 6 fino a 7,4 consistente nell'anticorpo e da 3 fino a 9 volte molarie in più di agente riducente. La miscela di reazione può venire incubata a 37°C per 2 h per ottenere un rapporto farmaco:anticorpo di 3 fino a 4. L'anticorpo coniugato a tossina viene quindi sottoposto a scambio del tampone in una miscela di reazione con un pH nell'intervallo fra 4 e 5 contenente 10 volte molarie in più di ligando di indirizzamento a PSMA. La reazione dell'anticorpo coniugato a tossina con il ligando di indirizzamento a PSMA può venire eseguita incubando a temperatura ambiente con delicato scuotimento per 8 fino a 16 ore. Solitamente,

la quantità di ligando di indirizzamento a PSMA rispetto all'intervallo di anticorpo fra 1,8 e 2 viene generata mediante questo metodo. Componenti non coniugati ottenuti dalla miscela di reazione vengono rimossi facendoli correre attraverso una colonna a scambio cationico e sottoposti a scambio del tampone in un tampone con formulazione proprietaria, che è isotonic con i fluidi corporei di topi e uomini. In un altro metodo, il ligando di indirizzamento a PSMA e la tossina possono venire coniugati in corrispondenza di siti specifici sull'anticorpo in una fase singola tramite chimica di coniugazione basata su ossima. Questa coniugazione a fase singola può venire facilitata progettando un legante ramificato contenente sia il ligando di indirizzamento a PSMA che la tossina. La coniugazione a fase singola può venire eseguita mediante chimica click basata su ossima e ciclo-ottino proprietaria. I componenti non coniugati possono venire rimossi dalla miscela di reazione facendoli correre attraverso una colonna di purificazione a scambio cationico. Il materiale purificato viene quindi formulato in un tampone isotonic. In aspetti esemplificativi, ligandi di indirizzamento a PSMA (L rappresenta un legante) comprendono, ma senza essere limitati a questi, i seguenti:

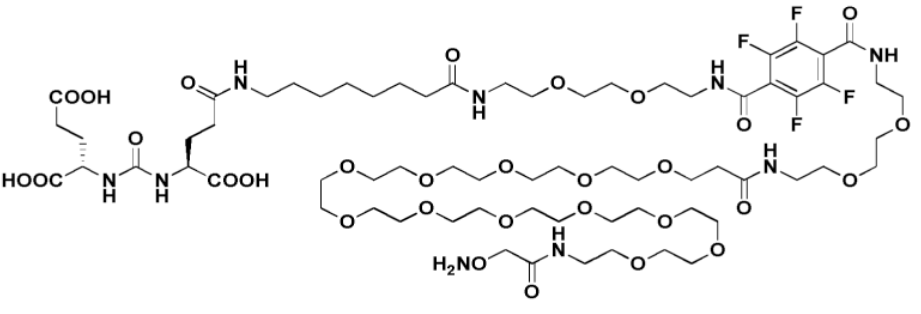
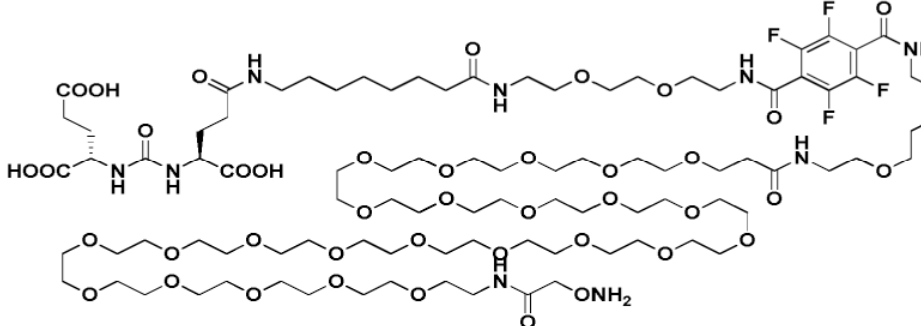
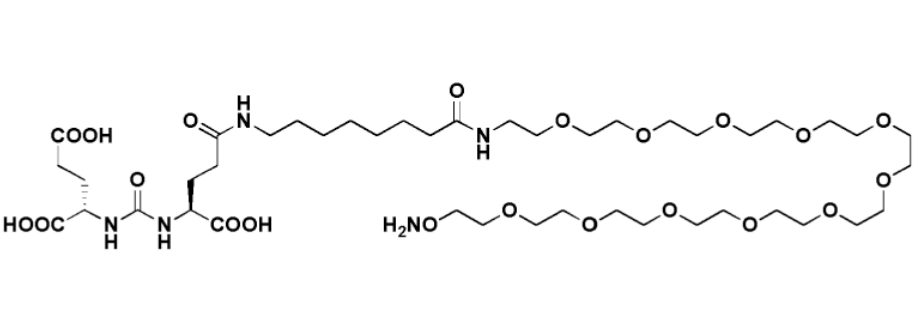


Ar: può essere qualsiasi di anelli aromatici o anelli aromatici fusi aventi 5, 6 elementi come (ma senza essere limitati a questi)

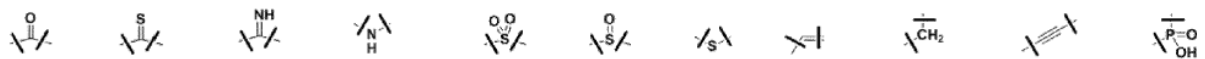




In aspetti esemplificativi, ligandi di PSMA della presente descrizione descrizione possono comprendere quei composti aventi un ligando di indirizzamento al N terminale e una porzione o parte di coniugazione al C terminale. In altri aspetti esemplificativi della presente descrizione, ligandi di indirizzamento a PSMA possono comprendere i seguenti (tabella 2), ma senza essere limitati a questi:

4	
5	
6	

In altri aspetti esemplificativi, la presente descrizione comprende ligandi di indirizzamento a PSMA e leganti in cui il legame fra il ligando di indirizzamento e il legante può essere, in un modo non limitativo:

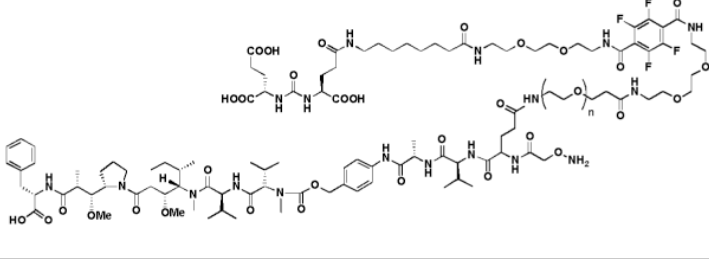
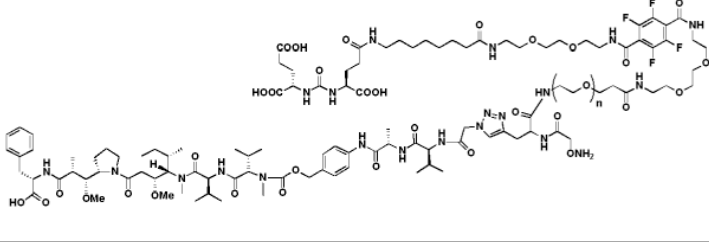
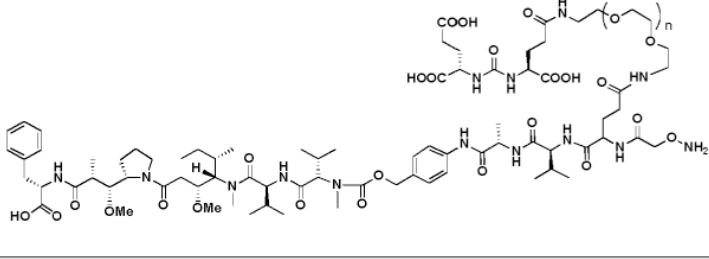
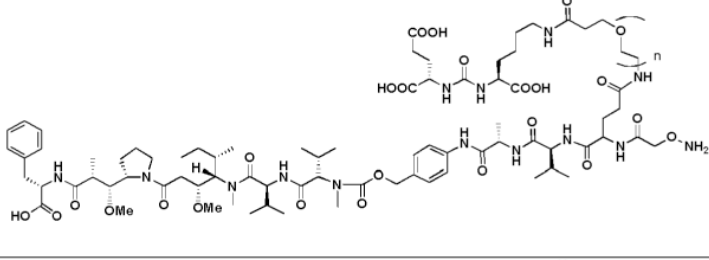
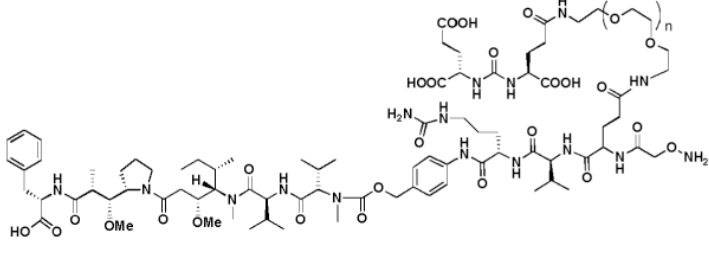


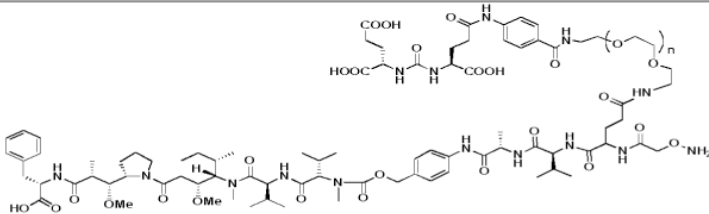
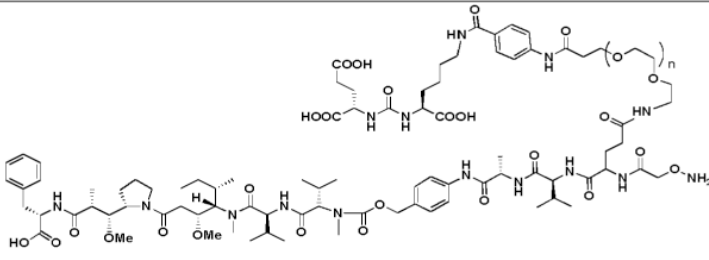
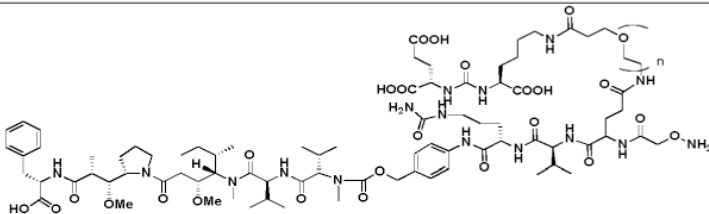
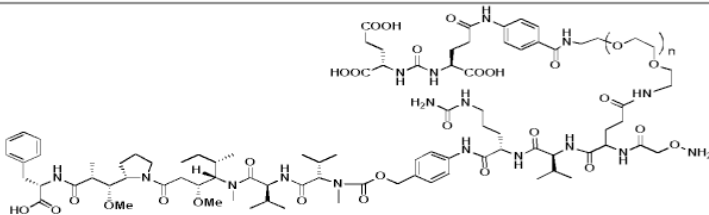
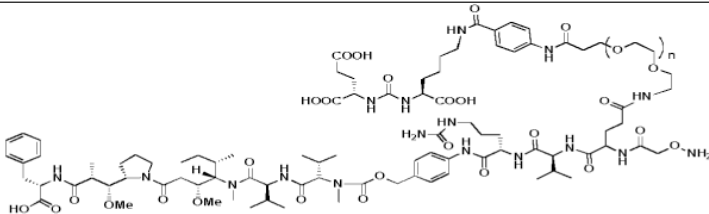
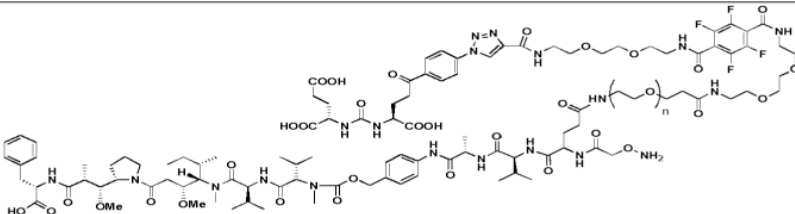
e il legame può essere idrogeno sostituito.

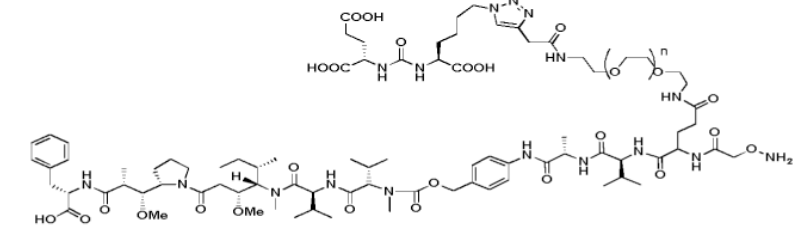
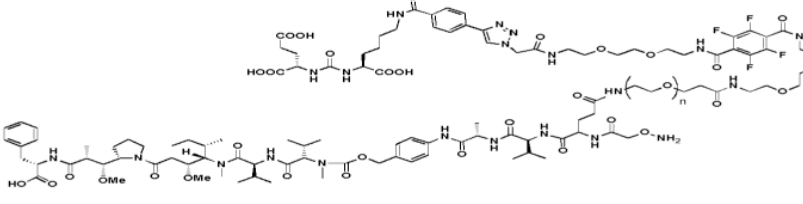
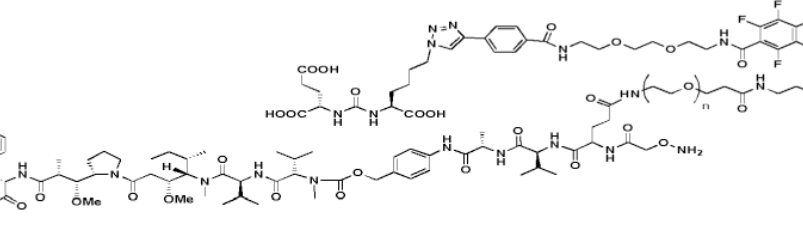
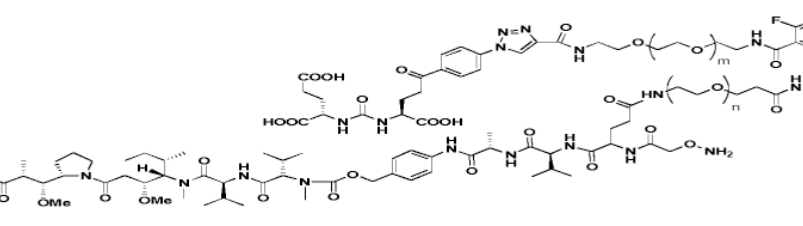
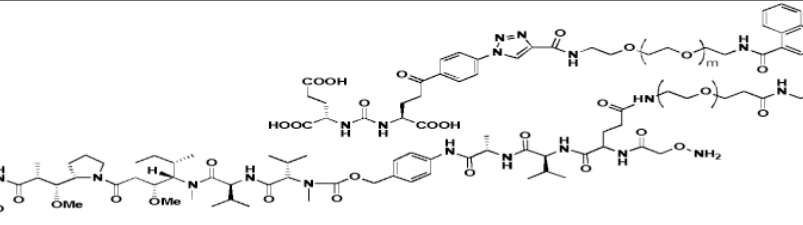
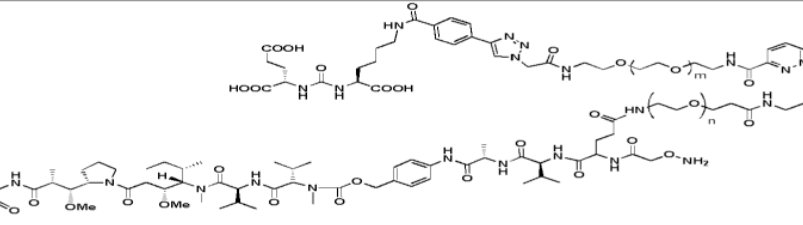
In altri aspetti della presente descrizione, il legante può essere, in un modo non limitativo, polietilenglicole (PEG), alchile, alchene, alchino, ammina, arile o amminoacidi. La chimica, la metodologia e le tecniche per il collegamento di leganti sono ben note nella tecnica.

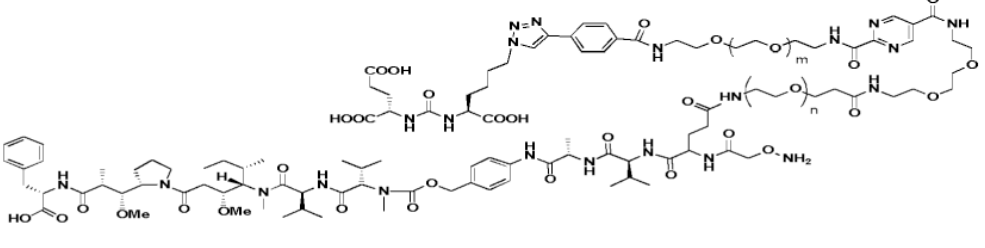
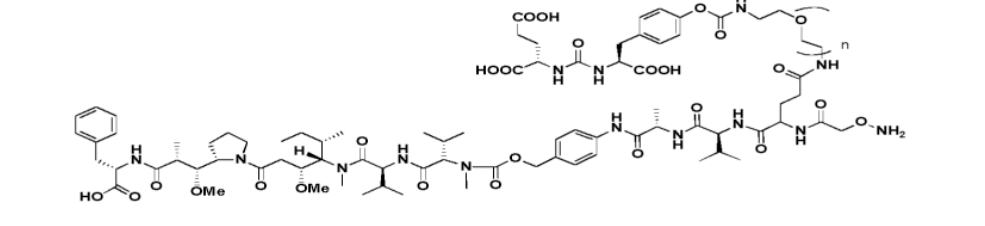
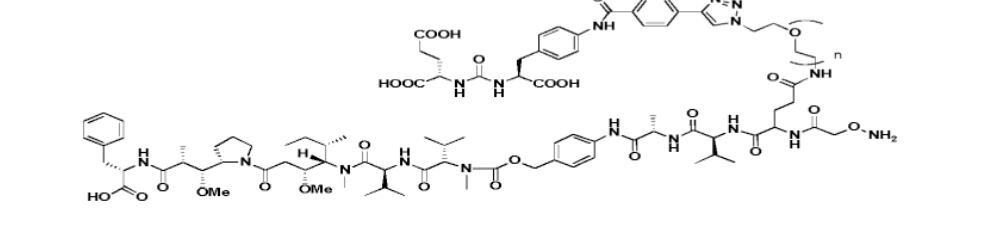
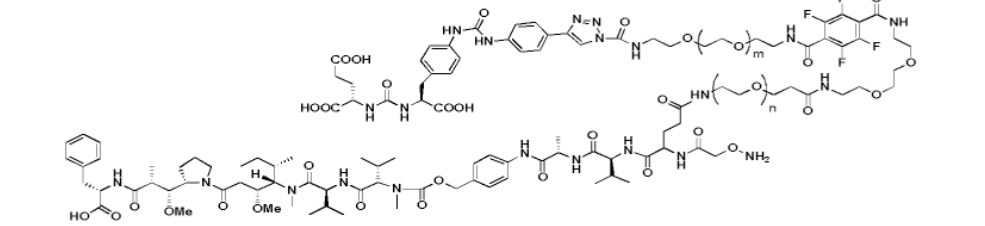
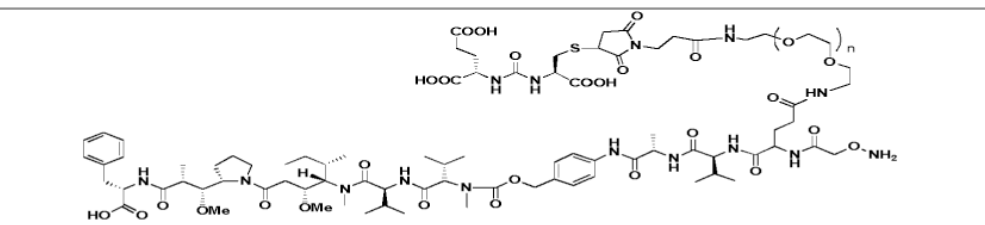
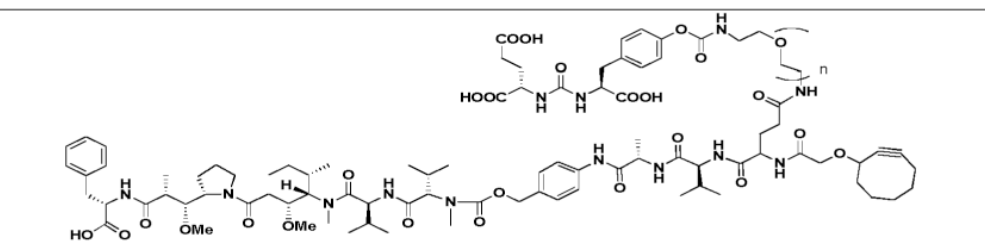
In un altro aspetto esemplificativo, la presente descrizione comprende ligandi di indirizzamento a PSMA con tossine (tabella 3) comprendenti, ma senza essere limitate a queste:

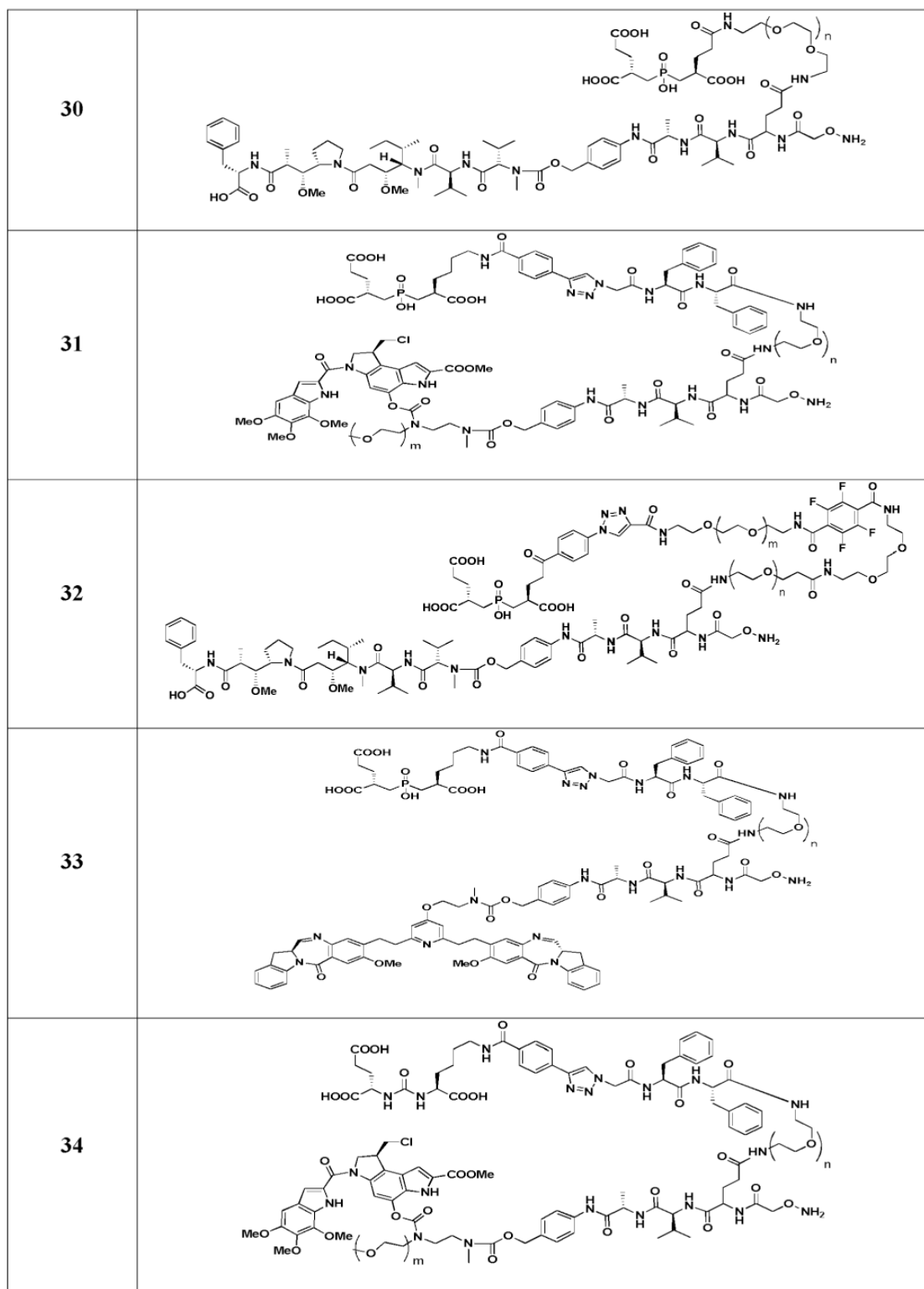
Tabella 3. Ligandi-tossine

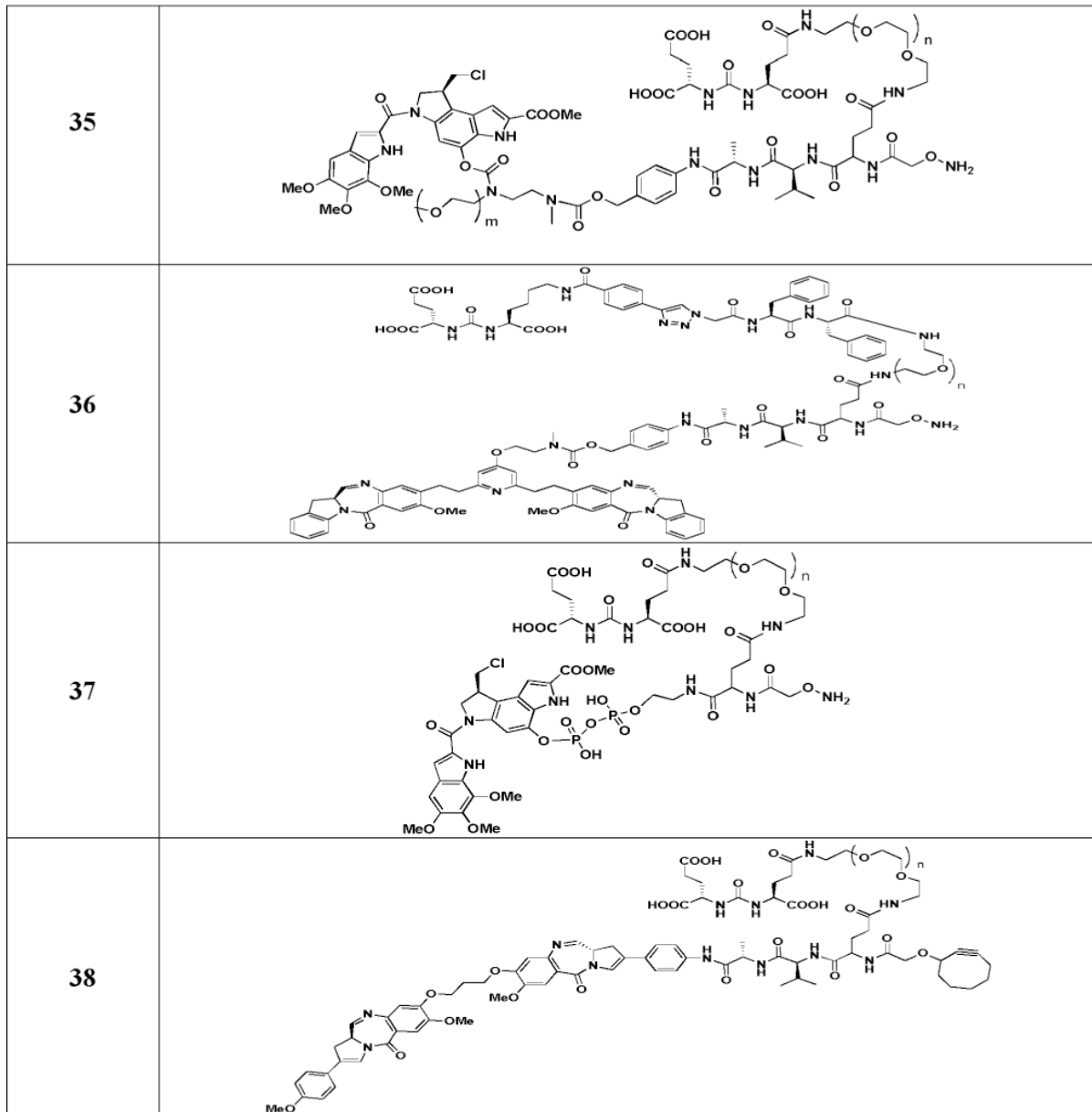
Esempio	Struttura
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	
11	

12	
13	
14	
15	
16	
17	

18	
19	
20	
21	
22	
23	





In alcuni aspetti della descrizione si desidera un anticorpo, variante o coniugato di farmaco anti-PSMA con aumento in semi-vita nel siero, solubilità in acqua, biodisponibilità, semi-vita terapeutica o tempo in circolazione, o modulare l'immunogenicità o l'attività biologica. Un metodo per ottenere tali caratteristiche desiderate della composizione anti-PSMA descritta in questa sede consiste nell'attacco covalente del polimero polietilenglicole (PEG). Per massimizzare le proprietà desiderate del polietilenglicole, il peso molecolare totale e

lo stato di idratazione del polimero o polimeri attaccati alla molecola biologicamente attiva devono essere sufficientemente alti da impartire le caratteristiche vantaggiose associate tipicamente con tale attacco del polimero, come solubilità in acqua e semi-vita in circolazione aumentate, pur non influenzando negativamente la bioattività della molecola alla quale viene attaccato il polietilenglicole.

Derivati di polietilenglicole vengono frequentemente legati a molecole biologicamente attive tramite funzionalità chimiche reattive, come residui amminoacidici, al N terminale, e/o parti di carboidrato. WO99/67291 descrive un procedimento per la coniugazione di una proteina con polietilenglicole, in cui almeno un residuo amminoacidico sulla proteina viene sostituito con un amminoacido sintetico e la proteina viene portata in contatto con polietilenglicole in condizioni sufficienti per ottenere la coniugazione alla proteina.

Proteine e altre molecole hanno spesso un numero limitato di siti reattivi disponibili per l'attacco del polimero. I siti maggiormente adatti per la modifica tramite attacco del polimero possono svolgere un ruolo significativo nel legame al recettore, e tali siti possono essere necessari per il mantenimento dell'attività biologica della molecola, rendendoli quindi inappropriati per l'attacco del polimero. Come risultato, l'attacco indiscriminato di catene polimeriche a tali siti reattivi su una molecola biologicamente attiva spesso porta a una riduzione significativa o anche a una perdita totale di attività biologica della molecola modificata con polimero, l'attacco di polietilenglicole può venire diretto a una particolare posizione entro una proteina affinché la parte di polietilenglicole non interferisca con la funzione di tale proteina. Un metodo per dirigere l'attacco di polietilenglicole consiste nell'introdurre un amminoacido sintetico nella sequenza della proteina. Il macchinario biosintetico della proteina del procariota *Escherichia coli* (*E. coli*) può venire alterato per incorporare amminoacidi sintetici in modo efficiente e con alta fedeltà in proteine in risposta al codone amber, UAG. Vedere, per esempio, J. W. Chin et al., J. Amer. Chem. Soc. 124: 9026-9027, 2002; J. W. Chin, & P. G. Schultz, ChemBioChem 3(11): 1135-1137, 2002; J. W. Chin, et al., PNAS USA 99: 11020-11024, 2002; e L. Wang, & P. G. Schultz, Chem. Comm., 1: 1-11, 2002. Un metodo simile può venire realizzato con l'eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (per esempio J. Chin et al., *Science* 301: 964-7, 2003). Usando questo metodo, un amminoacido codificato in modo non naturale può venire incorporato in un anticorpo, variante o

coniugato di farmaco anti-PSMA della presente descrizione, fornendo un sito di attacco per polietilenglicole. Vedere, per esempio, WO2010/011735 e WO2005/074650.

Composizioni farmaceutiche

In altri aspetti della presente descrizione, le varianti di anticorpo per PSMA o i coniugati farmaco-anticorpo per PSMA comprendono inoltre una composizione o formulazione farmaceutica. Tale composizione farmaceutica può impiegare vari eccipienti, stabilizzanti, tamponi e altri componenti farmaceuticamente accettabili per la somministrazione ad animali. Vedere, per esempio, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. L'identificazione di una composizione o formulazioni adatte per la stabilità, la somministrazione a un soggetto e l'attività varia con ciascun composto poiché un certo numero di componenti (per esempio componenti di purificazione, stabilizzazione) deve venire considerato. Sali adatti per l'inclusione nella composizione o formulazione possono comprendere, ma senza essere limitati a questi, cloruro di sodio, cloruro di potassio o cloruro di calcio. Possono venire usati agenti tamponanti e/o stabilizzanti come acetato di sodio. Tamponi adatti possono comprendere tampone fosfato-citrato, tampone fosfato, tampone citrato, L-istidina, L-arginina cloridrato, tampone bicarbonato, tampone succinato, tampone citrato e tampone TRIS, da soli o in combinazione. Possono venire anche impiegati tensioattivi comprendenti polisorbati (per esempio polisorbato 80), dodecilsolfato (SDS), lecitina, da soli o in combinazione.

In alcuni aspetti della presente descrizione, la composizione o formulazione farmaceutica può essere una composizione acquosa o nella forma di una composizione liquida ricostituita o come una polvere. La composizione o formulazione può avere un intervallo di pH da circa 4,0 fino a circa 7,0, o da circa 4,5 fino a circa 6,5 quando la formulazione è in una forma liquida. Tuttavia, il pH può venire regolato per fornire stabilità e somministrazione accettabili da parte del professionista medico esperto.

La composizione può venire conservata in una fiala o cartuccia, un dispositivo di somministrazione a penna, una siringa, una tubazione per somministrazione intravenosa o una sacca per somministrazione intravenosa, ma senza essere limitati a questi. In altri aspetti, una composizione farmaceutica della descrizione può venire somministrata come una singola dose o seguita da una o più dosi successive minuti, giorni o settimane dopo la

prima dose. Possono essere previste ulteriori somministrazioni quando necessario per trattare, ridurre o prevenire un cancro, compreso cancro della prostata.

In alcuni casi, gli anticorpi per PSMA, le varianti o le composizioni di ADC anti-PSMA della presente descrizione possono venire usati in congiunzione con una terapia o trattamento addizionali comprendenti, ma senza essere limitati a questi, chirurgia, radiazioni, crio-chirurgia, termoterapia, trattamento ormonale, chemioterapia, vaccini e altre immunoterapie. In alcuni aspetti, tale trattamento addizionale può comprendere un agente terapeutico come un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumorale, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione. In un aspetto, l'agente ormonale è enzalutammide.

In altri aspetti, gli ADC anti-PSMA della descrizione possono venire somministrati con uno o più agenti immunostimolanti per indurre o potenziare una risposta immunitaria. Agenti immunostimolanti possono stimolare bracci specifici del sistema immunitario, come cellule killer naturali (NK) che mediano la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC). Tali agenti immunostimolanti comprendono, ma senza essere limitati a questi, IL-2, oligonucleotidi immunostimolanti (per esempio motivi CpG), interferone α , interferone γ , fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α). In altri aspetti, gli ADC anti-PSMA della descrizione possono venire somministrati con uno o più immunomodulatori comprendenti, ma senza essere limitati a queste, citochine, chemiochine (comprendenti, ma senza essere limitate a questi, SLC5 ELC, MIP3 α , MIP3 β , IP-10, MIG e loro combinazioni). Altri agenti terapeutici possono essere un vaccino che immunizza un soggetto nei confronti di PSMA. Tali vaccini, in alcuni aspetti, comprendono antigeni, come dimeri di PSMA, con opzionalmente uno o più adiuvanti per indurre o potenziare una risposta immunitaria. Adiuvanti di molti tipi sono ben noti nella tecnica.

L'agente chemioterapeutico o qualsiasi agente coinvolto nel trattamento, nella riduzione o nella prevenzione di una malattia, una condizione o un cancro in un soggetto che ne necessita può anche venire somministrato in combinazione con un ADC anti-PSMA della descrizione. Agenti chemioterapeutici possono comprendere, ma senza essere limitati a questi, erlotinib (TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.), bortezomib

(VELCADE[®], Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX[®], AstraZeneca), sunitinib (SU11248, Pfizer), letrozolo (FEMARA[®], Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC[®], Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), ossaliplatino (Eloxatin[®], Sanofi), 5-FU (5-fluorouracile), leucovorina, Rapamicina (Sirolimo, RAPAMUNE[®], Wyeth), lapatinib (TYKERB[®], GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafamib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) e gefitinib (IRESSA[®], AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agenti alchilanti come tiotepa e CYTOXAN[®] ciclofosfammide; alchilsolfonati come busulfan, improsulfan e piposulfan; antineoplastico di antifolato come pemetrexed (ALIMTA[®], Eli Lilly), aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilamelammine comprendenti altretammina, trietilenmelammina, trietilenfosforammide, trietileniofosforammide e trimetilomelammina; acetogenine (specialmente bullatacina e bullatacinone); una camptotecina (compreso l'analogo sintetico topotecano); briostatina; callistatina; CC-1065 (compresi i suoi analoghi sintetici adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficine (in particolare criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (compresi gli analoghi sintetici KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratiostatina; una sarcodictina; spongistatina; mostarde azotate come clorambucile, clornafazina, colofosfammide, estramustina, ifosfammide, mecloretammina, ossido di mecloretammina cloridrato, melphalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfammide, mostarda di uracile; nitrosouree come carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibiotici come gli antibiotici di enediina, calicheamicina, calicheamicina gammaII e calicheamicina omegaII; dinemicina, compresa dinemicina A; bisfosfonati come clodronato; una esperamicina; come pure neocarzinostatina cromoforo e cromofori di antibiotico di enediina di cromoproteina correlata, aclacinomisine, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicine, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-ossol-L-norleucina, ADRIAMYCIN[®] doxorubicina (comprese morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e deossidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicine come mitomicina C, acido micofenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metaboliti come metotrexato e 5-fluorouracile (5-FU); analoghi di acido

folico come denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; analoghi di purina come fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; analoghi di pirimidina come ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideossiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; androgeni come calusterone, dromostanolone propionato, epitiostanolo, mepitioetano, testolattone; antiandrogeni (per esempio enzalutamide) o terapia di privazione degli androgeni; anti-adrenergici come aminoglutetimide, mitotano, trilostano; sostitutivi di acido folico come acido frolinico; aceglatone; aldofosfammide glicoside; acido aminolevulinico; eniluracile; amsacrina; bestrabucile; bisantrene; edatraxato; defofammina; demecolcina; diaziqone; elformitina; acetato di elliptinio; un epotilone; etoglucide; nitrato di gallio; idrossiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoidi come maitansina e ansamitocine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmolo; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrone; acido podofillinico; 2-etilidrazide; procarbazine; complesso di polisaccaride PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofurano; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziqone; 2,2',2''-triclorotrietilammina; tricoteceni (specialmente tossina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitolo; mitolattolo; pipobromano; gacitosina; arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfammide; tiotepa; tassoidi, per esempio paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] privo di Cremophor, albumina, formulazione in nanoparticelle di paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) e TAXOTERE[®] doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucile; GEMZAR[®] gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; analoghi di platino come cisplatino e carboplatino; vinblastina; platino; etoposide (VP-16); ifosfammide; mitoxantrone; vincristina; NAVELBINE[®] vinorelbina; novantrone; teniposide; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibitore di topoisomerasi RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoidi come acido retinoico; capecitabina; e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di qualsiasi dei precedenti.

Il termine "circa" verrà compreso da persone di ordinaria esperienza nella tecnica e varierà fino a un certo punto a seconda del contesto nel quale viene usato.

Esempi

Esempio 1: transfezione transiente. Colture di CHO-S sono state insemiante a $0,75 \times 10^6/\text{ml}$ approssimativamente 16 ore pre-transfezione in terreno per CHO FreeStyle. Le cellule sono state transfettate il giorno seguente quando il conteggio cellulare ha raggiunto $1,4-1,6 \times 10^6/\text{ml}$. Al conteggio cellulare bersaglio, è stata aggiunta una scorta di para-acetilfenilalanina (pAF) 400 mM a una concentrazione della coltura finale di 1,4 mM.

Un complesso di polietilenimmina/DNA (PEI/DNA) è stato preparato come descritto: DNA ($1,42 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cellule) è stato disciolto in terreno RPMI (5% (volume/volume) del volume di coltura totale), la miscela DNA/RPMI è stata incubata a temperatura ambiente per 2 minuti, una scorta di PEI (1 mg/ml) è stata aggiunta alla soluzione di DNA a un rapporto 3:1 (PEI/DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)), e la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 5 min.

La miscela è stata delicatamente aggiunta alla coltura cellulare e fatta roteare. I palloni sono stati trasferiti a un incubatore a 32°C. Al giorno 6 post-transfezione, è stata eseguita una analisi western blot. Al giorno 7 post-transfezione, il supernatante è stato raccolto.

Esempio 2: umanizzazione dell'anticorpo - L'anticorpo di topo parentale J591 (Liu et al., Cancer Research, 57, 3629-36354, 1997) è stato umanizzato scegliendo strutture umane in base all'identità di sequenza con le sequenze di struttura di topo. Le CDR della catena leggera e della catena pesante ottenute dall'anticorpo di topo sono state innestate rispettivamente sulle strutture umane, e analizzate per il legame all'antigene di PSMA. Varianti umanizzate sono state generate appaiando quattro strutture della catena pesante umana con sei strutture della catena leggera. Le varianti sono state espresse transientemente in cellule HEK293 e i supernatanti sono stati testati per il legame all'antigene di PSMA espresso in cellule LnCap mediante FACS. La tabella 4 descrive una sequenza della regione variabile della catena pesante e 4 sequenze della regione variabile della catena leggera scelte usate per ulteriori studi. L'analisi del legame ha dimostrato che quattro varianti a lunghezza intera umanizzate, mostrate come variante anti-PSMA umanizzata 1, 2, 3 e 4 (tabella 4), hanno mantenuto affinità di legame paragonabile alla chimera (tabella 4), presentando affinità di legame nell'intervallo nanomolare. Come descritto nella tabella 4, la variante anti-PSMA umanizzata 1 comprende la sequenza della catena pesante di

SEQ. ID. n.: 8 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9; la variante anti-PSMA umanizzata 2 comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 10 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 11; la variante anti-PSMA umanizzata 3 comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 12 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 13; e la variante anti-PSMA umanizzata 4 comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 14 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 15.

Tabella 4. Sequenze amminoacidiche di varianti di anticorpo anti-PSMA

Sequenze di anticorpi anti-PSMA umanizzati e chimerici
Sequenza della regione variabile della catena pesante umanizzata
SEQ. ID. n.: 1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWMGNINPNNGGTT YNQKFEDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSS
Sequenza della regione variabile della catena leggera umanizzata
SEQ. ID. n.: 2 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ. ID. n.: 3 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVDP RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ. ID. n.: 4 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQSEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
SEQ. ID. n.: 5 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTV
Sequenza della regione variabile della catena pesante chimerica

SEQ. ID. n.: 6

EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYN
QKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSS

Sequenza della regione variabile della catena leggera chimerica

SEQ. ID. n.: 7

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIWASTRHTGVDP
RFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTKVEIKRTV

Variante anti-PSMA umanizzata (lunghezza intera) 1

SEQ. ID. n.: 8

Catena pesante

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWMGNINPNNGGTT
YNQKFEDRVITITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ. ID. n.: 9

Catena leggera

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIWASTRHTGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Variante anti-PSMA umanizzata (lunghezza intera) 2

SEQ. ID. n.: 10

Catena pesante

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWMGNINPNNGGTT
 YNQKFEDRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ. ID. n.: 11

Catena leggera

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR
 FSGSGSGTEFTLTISLQSEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA
 DYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Variante anti-PSMA umanizzata (lunghezza intera) 3

SEQ. ID. n.: 12

Catena pesante

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWMGNINPNNGGTT
 YNQKFEDRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ. ID. n.: 13

Catena leggera

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVDP
 RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA
 DYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Variante anti-PSMA umanizzata (lunghezza intera) 4

SEQ. ID. n.: 14

Catena pesante

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWMGNINPNNGGTT
YNQKFEDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ. ID. n.: 15

Catena leggera

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Variante di anticorpo anti-PSMA chimerica (lunghezza intera)

SEQ. ID. n.: 16

Catena pesante

EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYN
QKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDAVYYCAAGWNFDYWGQGTTTLTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ. ID. n.: 17

Catena leggera

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVDP
RFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA
ADYEKHK

Esempio 3: espressione ricombinante di anticorpi anti-PSMA - Anticorpi anti-PSMA umanizzati principali sono stati scelti ed espressi ricombinantemente in cellule di CHO mediante sia transfezione transiente (descritta nell'esempio 1) che metodo del pool in massa stabile per esaminare l'espressione della sequenza umanizzata. Negli approcci di transfezione transiente e pool in massa stabile è stata costruita una tecnologia proprietaria rispettivamente nel vettore di espressione e nelle cellule ospiti di CHO (vedere, per esempio, WO2018/223108). L'amminoacido non naturale para-acetilfenilalanina (pAF) è stato incorporato nella posizione A114 (schema di numerazione di Kabat (vedere Kabat et al., pubblicazione NIH n. 369-847, 1993); posizione indicata nella tabella 4 tramite A), nell'anticorpo per PSMA, che è il primo residuo amminoacidico della regione costante della catena pesante.

Esempio 4: produzione di coniugati farmaco-anticorpo (ADC) - Gli anticorpi possono venire purificati usando metodi basati su cromatografia ben noti a una persona di ordinaria esperienza nella tecnica, che comportano cattura per affinità su proteina A e rifinitura per scambio cationico. L'anticorpo raccolto nel terreno di coltura cellulare viene catturato su una colonna per affinità di proteina A ed eluito in condizioni acide. La preparazione di anticorpo viene titolata a pH 5 e rifinita facendola correre attraverso una colonna a scambio cationico. Usando scambio cationico successivo, l'anticorpo può venire sottoposto a scambio del tampone in tampone di coniugazione.

Nella presente invenzione, l'anticorpo anti-PSMA umanizzato è stato coniugato a una tossina (MMAE o MMAF) tramite un legante idrofilo piccolo. Il farmaco-legante di un carico utile si coniuga covalentemente con la pAF nella catena pesante anti-PSMA portando alla formazione di ADC (più ADC) anti-PSMA. L'anticorpo per PSMA viene coniugato con il farmaco-legante di un carico utile mediante incubazione a 28°C in presenza di idrazide acetica 135 mM, che agisce come un catalizzatore. Anticorpi non coniugati, carico utile di farmaco-legante non coniugato, aggregati e impurità sono stati rimossi facendo correre la miscela di reazione attraverso una colonna per cromatografia a scambio cationico prima di scambiare il ADC anti-PSMA in tampone di formulazione (istidina 50 mM, cloruro di sodio 150 mM, 2,5% di trealosio, pH 6). Il coniugato farmaco-anticorpo è stato eluito dalla colonna sotto un gradiente di sale generando un picco monodisperso.

La caratterizzazione analitica del picco monodisperso ottenuto da cromatografia a scambio cationico ha dimostrato che la specie principale, che è ADC anti-PSMA con un rapporto fra farmaco e anticorpo (DAR) nell'intervallo fra 1,8 e 2, è stata osservata entro 8 ore. Valutazioni di controllo della qualità eseguito su anticorpi e ADC dell'invenzione hanno dimostrato che tutte le preparazioni generate mediante questa strategia hanno portato a materiali di qualità superiore contenenti < 3% di aggregati e < 5 EU/mg di livello di endotossina.

Quindici (15) ADC anti-PSMA sono stati generati con due varianti umanizzate principali e anticorpi chimerici utilizzando i 5 carichi utili-legante - MMAE non scindibile, MMAF non scindibile, MMAF scindibile, MMAF scindibile corta e MMAE scindibile corta descritte in questa sede. ADC anti-PSMA generati con le varianti umanizzate 1 e 2, descritte nella tabella 4, sono stati scelti per ulteriori studi negli esempi seguenti.

Esempio 5: studi di potenza *in vitro* - La potenza *in vitro* di ADC anti-PSMA viene determinata usando una linea cellulare rappresentativa di cancro della prostata resistente a castrazione metastatico (mCRPC), C4-2. La coltura cellulare viene incubata con coniugati farmaco-anticorpo per 96 ore a 37°C. La vitalità cellulare viene analizzata usando Cell Titer Glo® (Promega, USA). L'attività anti-proliferativa viene rappresentata dalla potenza, IC₅₀, la concentrazione alla quale viene ottenuto il 50% dell'attività massima, e dall'uccisione cellulare, ed E_{max}, il livello massimo di inibizione della crescita. La tabella 5 riassume l'uccisione cellulare e la potenza *in vitro* degli ADC anti-PSMA.

Tabella 5. Attività di uccisione cellulare *in vitro* in linee cellulari C4-2

Carico utile	Legante	Variante di anticorpo anti-PSMA umanizzata 1		Variante di anticorpo anti-PSMA umanizzata 2		Anticorpo anti-PSMA chimerico	
		IC ₅₀ (nM)	Uccisione cellulare (%)	IC ₅₀ (nM)	Uccisione cellulare (%)	IC ₅₀ (nM)	Uccisione cellulare (%)
MMAE	Non scindibile (PEG ₃)	11.3	64.5	12.5	67	10.2	62.5
MMAF	Non scindibile (PEG ₃)	0.543	80.5	0.503	81	0.295	89.5
MMAF	Scindibile (Val-citrullina-PEG ₁)	0.066	91	0.051	91	0.047	89.5
MMAF	Scindibile corto (valina-citrullina-acetile)	0.064	92	0.053	91	0.049	94.5
MMAE	Scindibile corto (valina-citrullina-acetile)	0.542	81.5	0.52	81.5	0.425	82.5

Il saggio di attività di uccisione cellulare suggerisce che la combinazione di carico utile-legante è critica per sviluppare coniugati farmaco-anticorpo potenti. Coniugati farmaco-anticorpo potenti hanno presentato potenza sub-nanomolare con >75% di uccisione cellulare. Coniugati farmaco-anticorpo con carichi utili di MMAF hanno rivelato uccisione cellulare e potenza superiori rispetto a coniugati farmaco-anticorpo con carichi utili di MMAE. Lo studio di uccisione cellulare *in vitro* suggerisce che ADC anti-PSMA con carico utile di MMAF presentano una potenza di ordine di grandezza superiore rispetto ad ADC anti-PSMA con carichi utili di MMAE.

Questo studio dimostra anche che l'attività del coniugato farmaco-anticorpo è anche influenzata dal tipo di legante. I coniugati farmaco-anticorpo con leganti scindibili hanno presentato uccisione cellulare e potenza superiori rispetto a coniugati farmaco-anticorpo con leganti non scindibili per lo stesso tipo di carico utile. Come rappresentato nella tabella 5, lo studio di uccisione cellulare *in vitro* ha dimostrato che ADC anti-PSMA con un

carico utile di MMAE o MMAF hanno presentato una potenza di ordine di grandezza superiore per leganti scindibili rispetto a leganti non scindibili. Questo suggerisce che ADC anti-PSMA potenti possono venire generati tramite la combinazione appropriata di carichi utili citotossici con leganti. La combinazione del carico utile MMAE con legante non scindibile ha rivelato potenza e uccisione scarse. Inoltre, l'uccisione di cellule bersaglio tramite gli ADC di anticorpo anti-PSMA viene ottenuta mediante somministrazione mirata di agenti citotossici tramite l'anticorpo anti-PSMA. La somministrazione mirata di agenti citotossici viene facilitata legando il componente di anticorpo anti-PSMA del coniugato farmaco-anticorpo al recettore o antigene, PSMA, espresso sulla superficie cellulare, il quale viene internalizzato nella cellula mediante il recettore. Studi con linee cellulari di cancro della prostata che non esprimono PSMA, come PC-3, suggeriscono che gli ADC anti-PSMA potenti non esercitano alcuna attività di uccisione cellulare. Linee cellulari PC-3 incubate con ADC anti-PSMA potenti per 96 ore non sono state uccise. Questo suggerisce che gli ADC anti-PSMA inventati sono specifici per il bersaglio. Non è stato notato un effetto di uccisione bystander dei coniugati farmaco-anticorpo. La mancanza di effetto di uccisione bystander dei coniugati farmaco-anticorpo inventati è critica per l'eliminazione di tossicità fuori bersaglio non specifiche dovute al componente di tossina, che vengono spesso osservate in coniugati farmaco-anticorpo contenenti MMAE come i carichi utili citotossici. Inoltre, l'attività specifica per il bersaglio degli ADC anti-PSMA inventati rende questi ADC di valore per il trattamento di cancro della prostata metastatico. L'osservazione ottenuta da questi studi suggerisce che qualsiasi lesione cancerosa oltre il tessuto della prostata canceroso primario che esprime PSMA può venire trattata con gli ADC anti-PSMA inventati. Inoltre, l'attività di uccisione cellulare degli ADC anti-PSMA è dipendente dal numero di recettori espressi sulla superficie cellulare. Linee cellulari di cancro della prostata con numeri di copie del recettore >60.000 possono venire uccise efficientemente tramite gli ADC anti-PSMA dell'invenzione. Per esempio, lo studio di uccisione cellulare *in vitro* eseguito con ADC anti-PSMA contenenti un carico utile di MMAF con legante non scindibile ha dimostrato l'uccisione di linee cellulari con un numero di copie del recettore >60.000, tabella 6, mediante analisi con immunistochemica (IHC) e immunofluorescenza indiretta quantitativa (Qifi).

Tabella 6. Espressione di PSMA e attività di citotossicità *in vitro* di ADC anti-PSMA in linee cellulari di cancro della prostata umano

Linea cellulare di PCa	Tipo di tumore	Numero di PSMA della superficie cellulare (QiFi)	IC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	Punteggio IHC di PSMA
C4-2	Prostata	84378 (± 24440)	1.498	86	3 [‡]
MDA-PCa-2B	Prostata	67771 (± 7636)	0.436	62	3 ^{††}
VCap	Prostata	13470 (± 4278)	Nessuna attività		1 ^{††}
22Rv1	Prostata	8572 (±2123)	Nessuna attività		1 [‡]
PC-3	Prostata	890 (± 727)	Nessuna attività		Negativo

[‡] - Determinato da blocchi di xenotrapianto di tumore in vivo; [†] - Non determinato a causa della crescita scarsa

^{††} - Determinato da pellet di cellule

La dipendenza dell'attività di uccisione cellulare degli ADC anti-PSMA inventati dal numero di copie del recettore di PSMA è indicativa del vantaggio terapeutico per il trattamento di cancro della prostata. Il numero di copie del recettore di PSMA è solitamente alto in tessuto della prostata canceroso rispetto all'espressione di PSMA in tessuti senza cancro. Questa espressione differenziale nel numero di copie del recettore di PSMA fra tessuto della prostata canceroso e tessuti normali può facilitare la riduzione e/o eliminazione di tossicità correlata a tessuto non prostatico correlata al bersaglio. Questa analisi suggerisce che gli ADC anti-PSMA possono presentare bassa attività in tessuti che esprimono bassi numeri di copie del recettore di PSMA rispetto a tessuto della prostata canceroso con alto numero di copie del recettore di PSMA. Quindi, la tossicità di fondo del coniugato farmaco-anticorpo può venire significativamente diminuita.

Esempio 6: profilo farmacocinetico (PK) con carico utile di farmaco-legante - La stabilità sistemica degli ADC anti-PSMA in questa sede può venire valutata eseguendo studi farmacocinetici sia in topi che ratti in cui i coniugati farmaco-anticorpo vengono somministrati come un bolo intravenoso (i.v.). La valutazione farmacocinetica suggerisce che la stabilità del coniugato farmaco-anticorpo intatto dipende dalla stabilità del legante. Studi eseguiti in topi a una singola dose di 1 mg/kg suggeriscono che ADC anti-PSMA con carico utile

di MMAF legato tramite legante non scindibile o scindibile corto (Val-citrullina-acetile) rimangono intatti per tutta la durata dello studio. La semi-vita degli ADC anti-PSMA intatti con carico utile di MMAF legato tramite non scindibile o scindibile corto è 10 giorni, figura 1 (2 riquadri in alto). La stabilità sistemica del legante scindibile corto è indipendente dal carico utile. Il legante nel ADC anti-PSMA con carico utile di MMAE legato tramite legante scindibile corto rimane anche intatto per tutta la durata dello studio con semi-vita del coniugato farmaco-anticorpo intatto essendo di 10 giorni, figura 1 (riquadro a destra in basso). Tuttavia, al contrario, il legante nel ADC anti-PSMA con carico utile di MMAF legato tramite un legante scindibile (Val-citrullina-PEG₁) viene scisso prima, diminuendo la semi-vita del coniugato farmaco-anticorpo intatto ad approssimativamente 4 giorni, figura 1 (riquadro a sinistra in basso). F1 rappresenta la rilevazione del coniugato farmaco-anticorpo nel siero mediante l'anticorpo. F3 rappresenta la rilevazione del coniugato farmaco-anticorpo nel siero mediante il legante di tossina-carico utile.

La stabilità sistemica del ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile è stata anche valutata in ratti a dosi di 1 mg/kg e 5 mg/kg. Lo studio ha rivelato che il coniugato farmaco-anticorpo è stabile, con il legante e l'agente citotossico che rimangono intatti per tutta la durata dello studio, figura 2.

Studi sono stati eseguiti in ratti per confrontare il profilo farmacocinetico degli ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile e dell'anticorpo anti-PSMA (indicato come anticorpo nudo) senza agente citotossico. La valutazione del profilo farmacocinetico suggerisce che la clearance di ADC anti-PSMA con MMAF non scindibile è simile all'anticorpo anti-PSMA, figura 3. Questo suggerisce che la stabilità intrinseca dell'anticorpo non viene influenzata dalla coniugazione sito-specifica basata su p-acetilfenilalanina e dal caricamento del farmaco.

La stabilità del coniugato farmaco-anticorpo è essenziale nel diminuire la tossicità causata dall'agente citotossico. La prevenzione della scissione dell'agente citotossico dal coniugato farmaco-anticorpo mentre si trova in circolazione sistemica è un modo critico di diminuzione della tossicità. Gli ADC anti-PSMA descritti con leganti non scindibili e scindibili corti sono significativamente stabili nella circolazione sistemica con l'agente citotossico che rimane attaccato all'anticorpo. Questo è significativo poiché la maggior parte dei

coniugati farmaco-anticorpo sono instabili, con il carico utile di farmaco che si distacca dal legante e/o dal sito di coniugazione, e porta quindi a una tossicità correlata non per il bersaglio significativa per effetto dell'agente citotossico. L'applicazione terapeutica di un coniugato farmaco-anticorpo è attualmente limitata a causa di tale tossicità. La maggior parte dei coniugati farmaco-anticorpo in prove cliniche ha rivelato tossicità che limitano la dose che potrebbero venire ascritte all'agente citotossico. A causa di tali tossicità, l'applicazione terapeutica di un coniugato farmaco-anticorpo è stata limitata, e attualmente solamente quattro coniugati farmaco-anticorpo sono stati approvati per applicazioni terapeutiche. Il trattamento del cancro della prostata con coniugati farmaco-anticorpo che mirano PSMA si è dimostrato impegnativo nel campo fino ad ora per effetto di tossicità gravi e mancanza di indice terapeutico. I dati farmacocinetici suggeriscono che gli ADC anti-PSMA inventati possono superare le limitazioni derivanti da tossicità non specifica a causa dell'agente citotossico, prevenendo la scissione del carico utile di farmaco dal legante e/o dal sito di coniugazione tramite combinazione unica di chimica di coniugazione stabile con un legante stabile. La chimica di coniugazione stabile utilizzata nella generazione dei nuovi ADC anti-PSMA dell'invenzione può venire ottenuta mediante formazione di un legame di chetossima fra un amminoacido innaturale/non naturale, per esempio *p*-acetilfenilalanina, incorporato nell'anticorpo in corrispondenza di posizioni specifiche e il legante di farmaco-carico utile derivatizzato con un gruppo idrossilammina.

Esempio 7: studi di efficacia *in vivo* - L'efficacia anti-tumore degli ADC anti-PSMA, con MMAF non scindibile e scindibile corta, è stata testata in un modello di xenotrapianto di tumore in topi innestati con una linea cellulare di cancro della prostata. La linea cellulare pertinente di cancro della prostata resistente a castrazione metastatico (mCRPC), C4-2, è stata ottenuta da ATCC ed espansa *in vitro* seguendo le istruzioni di ATCC. Xenotrapianti di carcinoma umano C4-2 sono stati fatti crescere in topi maschi immunocompromessi con cellule impiantate sottocutaneamente. I topi sono stati pesati e misurati per il volume del tumore usando un calibro elettronico. Il volume del singolo tumore è stato calcolato come $\text{lunghezza} \times \text{larghezza} \times \text{larghezza}/2$. I topi con tumori vascolarizzati (determinati dall'aspetto) con un volume medio di 500 mm^3 sono stati casualizzati in gruppi di trattamento e sono stati dosati intravenosamente per singolo peso corporeo. Gli ADC anti-PSMA sono stati

somministrati a 0,1, 1, 5 e 10 mg/kg.

Gli studi suggeriscono che gli ADC anti-PSMA con entrambe di MMAF non scindibile e scindibile corta erano efficaci nel prevenire la crescita del tumore. A 5 mg/kg e 10 mg/kg, gli ADC anti-PSMA erano efficaci nell'inibire la crescita del tumore per 37 giorni dopo il dosaggio. A 1 mg/kg, gli ADC anti-PSMA erano efficaci nella stasi del tumore fino a quando è stata osservata ricrescita dopo 35 giorni dopo il dosaggio. Al dosaggio di 0,1 mg/kg, non è stata osservata una differenziazione significativa dai controlli. L'analisi del peso corporeo ha dimostrato che gli animali trattati hanno anche guadagnato peso come i topi sani normali, implicando nessuna tossicità evidente associata con gli ADC anti-PSMA. Le figure 4A e 4B rappresentano i risultati del volume del tumore e del peso corporeo rappresentativi di ADC anti-PSMA dell'invenzione comprendenti MMAF non scindibile. Le figure 5A e 5B rappresentano i risultati del volume del tumore e del peso corporeo rappresentativi di ADC anti-PSMA dell'invenzione comprendenti MMAF scindibile corta.

Esempio 8: studi farmacocinetici con MMAF non scindibile - Le farmacocinetiche (PK) sono state valutate in topi portatori di tumore e non portatori dopo una singola dose di ADC anti-PSMA che usa una MMAF non scindibile. I topi sono stati iniettati tramite iniezione intravenosa di bolo con 1 mg/kg o 5 mg/kg del ADC con MMAF non scindibile. Il siero è stato prelevato e analizzato per la presenza del ADC con MMAF non scindibile. A entrambi i livelli della dose valutati, 1 mg/kg e 5 mg/kg, sono stati osservati profili PK simili per le concentrazioni di ADC anti-PSMA in topi portatori di tumore e non portatori (figura 6A).

Le farmacocinetiche (PK) sono anche state valutate in scimmie cinomolgo dopo somministrazione di una singola dose di ADC anti-PSMA che usa una MMAF non scindibile a varie concentrazioni di 1,17 mg/kg, 3,86 mg/kg, 9,36 mg/kg, 11,7 mg/kg, 23,3 mg/kg e 35,0 mg/kg (figura 6B). ADC anti-PSMA sono stati somministrati come una infusione intravenosa (la via di somministrazione prevista nell'uso clinico), da 15 fino a 20 minuti. Dopo il dosaggio, campioni sono stati prelevati fino a 28 giorni. La bioanalisi per ADC anti-PSMA intatto è stata eseguita usando un metodo qualificato Meso Scale Discovery. Profili PK sovrapposti sono stati osservati per ADC intatto e anticorpo totale, confermando che gli ADC anti-PSMA della presente invenzione sono estremamente stabili in circolazione sistemica. Un aumento non lineare nell'esposizione è stato osservato a dosi

più basse (1,17 mg/kg fino a 3,86 mg/kg), il che potrebbe venire attribuito alla possibile eliminazione mediata dal bersaglio. Un ulteriore aumento nella dose ha portato a un aumento relativamente lineare nelle esposizioni con aumento nella dose. La clearance era lenta, essendo nell'intervallo da 0,118 ml/h/kg fino a 0,304 ml/h/kg, e il volume di distribuzione era piccolo, essendo nell'intervallo da 44,2 ml/kg fino a 58,2 ml/kg. La semi-vita risultante era lunga essendo nell'intervallo da 129 ore fino a 346 ore, con una tendenza generale per un aumento nella semi-vita con un aumento nella dose. Occorre notare che l'estrema stabilità di ADC anti-PSMA nella circolazione sistemica minimizza la tossicità fuori bersaglio correlata al rilascio di carico utile libero dal ADC, la promozione della semi-vita lunga permette quindi a un paziente di accettare un regime di dosaggio di una volta ogni 3 o 4 settimane.

Esempio 9: terapia in combinazione con ADC anti-PSMA - Gli ADC anti-PSMA della presente invenzione possono venire usati in combinazione con qualsiasi agente coinvolto nel trattamento, nella riduzione, nel miglioramento o nella prevenzione di cancro della prostata in un soggetto che ne necessita comprese, ma senza essere limitate a queste, terapia ormonale o chemioterapia. Per esempio, la terapia ormonale con enzalutammide ha dimostrato, *in vitro*, di aumentare l'espressione dell'espressione di PSMA sulla superficie cellulare di approssimativamente 3 volte (Murga et al., Prostate 15; 75(3):242-54, 2015). Inoltre, topi trattati con enzalutammide portatori di tumori della prostata PDX umani hanno dimostrato inibizione aumentata della crescita del tumore quando combinati con un ADC per PSMA con il carico utile auristatina, MMAE (DiPippo et al., Prostate 15; 76(3):325-34, 2016). In base all'aumento nell'espressione di PSMA notato nella tecnica, gli inventori hanno studiato l'effetto *in vivo* di terapia in combinazione usando gli ADC anti-PSMA inventati con il carico utile MMAF ed enzalutammide.

L'efficacia anti-tumore degli ADC anti-PSMA dell'invenzione in combinazione con la terapia ormonale con enzalutammide è stata testata in un modello di xenotrapianto di tumore in topi innestati con una linea cellulare di cancro della prostata. La linea cellulare pertinente di cancro della prostata resistente a castrazione metastatico (mCRPC), C4-2, è stata ottenuta da ATCC ed espansa *in vitro* seguendo le istruzioni di ATCC. Xenotrapianti di carcinoma umano C4-2 sono stati fatti crescere in topi maschi immunocompromessi con cellule impiantate

sottocutaneamente. È stato anche studiato un secondo modello usando topi maschi immunocompromessi portatori di tumori della prostata da xenotrapianto derivato da paziente (PDX) TM00298 (Jackson Laboratories, CA).

I topi sono stati pesati e misurati per il volume del tumore usando un calibro elettronico. Il volume del singolo tumore è stato calcolato come $\text{lunghezza} \times \text{larghezza} \times \text{larghezza}/2$. Topi con tumori vascolarizzati (determinati dall'aspetto) con un volume medio di 500 mm^3 sono stati casualizzati in gruppi di trattamento e sono stati dosati intravenosamente per singolo peso corporeo. Gli ADC anti-PSMA sono stati somministrati intravenosamente a 0,5, 1 e 3 mg/kg una volta alla settimana per 4 settimane nel modello con C4-2 e a 1 e 3 mg/kg una volta alla settimana per 4 settimane nel modello con PDX. In entrambi i modelli di prostata, enzalutammide è stata somministrata oralmente giornalmente a 10 mg/kg per 28 giorni. In entrambi i modelli di prostata, a un gruppo di topi è stata somministrata una terapia in combinazione di 1 mg/kg di ADC anti-PSMA più 10 mg/kg di enzalutammide, figure 7 e 8. Per il modello con PDX, ai topi è stata anche somministrata una terapia in combinazione di 3 mg/kg di ADC anti-PSMA più 10 mg/kg di enzalutammide, figura 8.

Gli ADC anti-PSMA a 3 mg/kg e 1 mg/kg hanno dimostrato che l'inibizione del tumore è responsiva alla dose in un modello resistente a enzalutammide. L'inibizione completa è stata ottenuta a 3 mg/kg con l'80% di TGI (inibizione della crescita tumorale percentuale). Risposta parziale è stata osservata a 1 mg/kg con il 37% di TGI. L'analisi del peso corporeo suggerisce che gli animali trattati hanno anche guadagnato peso come i topi normali sani, implicando nessuna tossicità evidente associata con ADC anti-PSMA. Le figure 7A e 8A rappresentano i risultati del volume del tumore e del peso corporeo (figura 7B e 8B) rappresentativi di ADC anti-PSMA dell'invenzione comprendenti MMAF non scindibile.

Questo studio ha dimostrato l'efficacia migliorata con ADC anti-PSMA della presente invenzione in combinazione con enzalutammide. Enzalutammide, come un singolo agente, ha aumentato il livello di PSMA sulla superficie cellulare in cellule di cancro della prostata. La combinazione di ADC anti-PSMA con enzalutammide ha dimostrato %TGI maggiore rispetto alla monoterapia. Questi studi suggeriscono che ADC anti-PSMA con MMAF sia non scindibile che scindibile corta erano efficaci nel prevenire la crescita del tumore

con un effetto sinergico in presenza di enzalutammide.

Esempio 10: prova clinica umana della sicurezza e/o efficacia di un coniugato farmaco-anticorpo (ADC) anti-PSMA per terapia di cancro della prostata

Obiettivo: confrontare la sicurezza e le farmacocinetiche di una composizione somministrata comprendente ADC anti-PSMA della presente invenzione.

Progetto dello studio: questo studio sarà uno studio di aumento della dose in fase I, a singolo centro o multicentro, in aperto, casualizzato seguito da uno studio in fase II in pazienti con cancro della prostata. I pazienti non devono aver avuto esposizione a un derivato di PSMA prima dell'ingresso nello studio. I pazienti non devono aver ricevuto trattamento per il loro cancro entro 2 settimane dall'inizio della prova. I trattamenti comprendono l'uso di chemioterapia, fattori di crescita ematopoietici e terapia biologica come anticorpi monoclonali. I pazienti devono aver recuperato da tutte le tossicità (fino a un grado 0 o 1) associate con il trattamento precedente. Tutti i soggetti sono stati valutati per la sicurezza e tutti i prelievi di sangue per l'analisi farmacocinetica sono stati raccolti come programmato. Tutti gli studi sono stati eseguiti con l'approvazione di comitati etici istituzionali e il consenso da parte del paziente.

Fase I: i pazienti ricevono ADC anti-PSMA intravenosamente su cicli di dosaggio una volta ogni 3 settimane. Le dosi di ADC anti-PSMA possono venire mantenute o modificate per la tossicità in base a valutazioni come delineate in seguito. Il trattamento si ripete ogni 3 settimane in assenza di tossicità inaccettabile. Coorti di 3-6 pazienti ricevano dosi crescenti di ADC anti-PSMA fino a quando viene determinata la dose massima tollerata (MTD) per ADC anti-PSMA. La MTD viene definita come la dose precedente a quella alla quale 2 su 3 o 2 su 6 pazienti hanno provato una tossicità che limita la dose. Tossicità che limitano la dose vengono determinate secondo le definizioni e gli standard esposti dalla Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Versione 3.0 (9 agosto 2006) del National Cancer Institute (NCI).

Fase II: i pazienti ricevono ADC anti-PSMA come nella fase I alla MTD determinata nella fase I. Il trattamento si ripete ogni 3 settimane per vari cicli in assenza di progressione della malattia o tossicità inaccettabile. Dopo completamento del corso della terapia dello studio, pazienti che hanno ottenuto una risposta completa o parziale

possono ricevere dosi aggiuntive. Pazienti che hanno mantenuto la malattia stabile per più di 2 mesi dopo completamento di 6 corsi della terapia dello studio possono ricevere altri 6 corsi al momento della progressione della malattia, purché soddisfino i criteri di idoneità originali.

Campionamento del sangue. Sangue in serie viene prelevato mediante venipuntura diretta prima e dopo somministrazione di ADC anti-PSMA. Campioni di sangue venoso (5 ml) per la determinazione delle concentrazioni nel siero vengono ottenuti circa 10 minuti prima del dosaggio e approssimativamente ai tempi seguenti dopo il dosaggio: 0,5 e 4 ore, giorni 1, 2, 4, 7, 14 e 21. Ciascun campione di siero viene suddiviso in due aliquote. Tutti i campioni di siero vengono conservati a -20°C. I campioni di siero vengono spediti su ghiaccio secco.

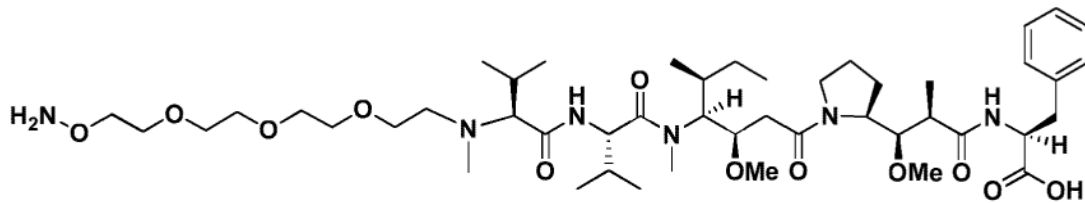
Farmacocinetiche: i pazienti vengono sottoposti a raccolta di un campione di plasma/siero per la valutazione farmacocinetica prima dell'inizio del trattamento e dopo somministrazione del farmaco dello studio a 0,5 e 4 ore, ai giorni 1, 2, 4, 7, 14 e 21. I parametri farmacocinetici vengono calcolati mediante metodi indipendenti dal modello usando l'ultima versione del software Phoenix WinNonlin. Vengono determinati i seguenti parametri farmacocinetici: concentrazione di picco nel siero (C_{max}); tempo fino alla concentrazione di picco nel siero (t_{max}); area sotto la curva di concentrazione-tempo (AUC) dal tempo zero fino al tempo dell'ultimo campionamento di sangue (AUC_{last}) calcolata con l'uso della regola trapezoidale lineare; e semi-vita all'eliminazione terminale ($t_{1/2}$), calcolata dalla costante della velocità di eliminazione. La costante della velocità di eliminazione viene stimata mediante regressione lineare di punti di dati consecutivi nella regione lineare terminale del grafico di concentrazione-tempo log-lineare. La media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) dei parametri farmacocinetici vengono calcolati per ciascun trattamento. Viene calcolato il rapporto delle medie del parametro (formulazione conservata/formulazione non conservata).

Risposta del paziente alla terapia in combinazione: la risposta del paziente viene valutata tramite formazione di immagini con raggi X, scansioni CT e MRI, e la formazione di immagini viene eseguita prima dell'inizio dello studio e al termine del primo ciclo, con formazione di immagini addizionale eseguita ogni quattro settimane o al termine del ciclo successivo. Le modalità di formazione di immagini vengono scelte in base al tipo di cancro e

alla fattibilità/disponibilità, e la stessa modalità di formazione di immagini viene utilizzata per tipi di cancro simili come pure per tutto il corso dello studio di ciascun paziente. I tassi di risposta vengono determinati usando i criteri RECIST (Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 92(3):205-16, 2000; sul world wide web presso <http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). I pazienti vengono anche sottoposti a biopsia del cancro/tumore per valutare cambiamenti nel fenotipo della cellula cancerosa progenitrice e nella crescita clonogenica mediante citometria a flusso, Western blotting e IHC, e per cambiamenti nella citogenetica mediante FISH. Dopo completamento del trattamento dello studio, i pazienti vengono seguiti periodicamente per 4 settimane.

RIVENDICAZIONI

1. Coniugato farmaco-anticorpo comprendente un anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (anticorpo anti-PSMA) coniugato a un farmaco-legante, in cui la coniugazione avviene tramite una para-acetilfenilalanina incorporata nella sequenza della catena pesante, in cui l'anticorpo anti-PSMA comprende la sequenza della catena pesante di SEQ. ID. n.: 8 e la sequenza della catena leggera di SEQ. ID. n.: 9, in cui una para-acetilfenilalanina è incorporata nella posizione A114 della catena pesante secondo lo schema di numerazione di Kabat, e in cui il farmaco-legante è una monometilauristatina F non scindibile avente la struttura:



2. Composizione farmaceutica comprendente il coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 e almeno un adiuvante, legante, tampone, veicolante, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile.
3. Composizione farmaceutica della rivendicazione 2, comprendente inoltre un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.
4. Coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 o composizione farmaceutica della rivendicazione 2 per l'uso in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprimono PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica.
5. Composizione farmaceutica della rivendicazione 3 per l'uso in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprimono PSMA, detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace della composizione farmaceutica.

6. Coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 o composizione farmaceutica della rivendicazione 2 e un agente terapeutico addizionale, per l'uso in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprimono PSMA,

detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

7. Coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 o composizione farmaceutica della rivendicazione 2, per l'uso con un agente terapeutico addizionale in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprimono PSMA,

detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo o della composizione farmaceutica, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

8. Agente terapeutico addizionale per l'uso con il coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 o la composizione farmaceutica della rivendicazione 2 in un metodo di riduzione o inibizione della crescita o progressione del tumore in un cancro o una cellula cancerosa che esprimono PSMA,

detto metodo comprendendo il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace dell'agente terapeutico addizionale, e comprendendo inoltre il portare in contatto il cancro o la cellula cancerosa che esprimono PSMA con una quantità efficace del coniugato farmaco-anticorpo della rivendicazione 1 o della composizione farmaceutica della rivendicazione 2, in cui l'agente terapeutico

addizionale è un agente chemioterapeutico, un agente ormonale, un agente antitumore, un agente immunostimolante, un immunomodulatore, un corticosteroide o una loro combinazione.

9. Composizione farmaceutica; coniugato farmaco-anticorpo o composizione farmaceutica e agente terapeutico addizionale; coniugato farmaco-anticorpo o composizione farmaceutica; o agente terapeutico addizionale; per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, in cui l'agente terapeutico addizionale è un agente ormonale, e in cui l'agente ormonale è enzalutammide.

Si dichiara che la presente traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Il mandatario

Società Italiana Brevetti S.p.A.

LEGENDA – LISTA SEQUENZE

SEQUENCE LISTING	ELENCO SEQUENZE
Novel Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Antibody Drug Conjugates	Nuovi coniugati farmaco-anticorpo anti-antigene prostatico-specifico di membrana (PSMA)
62/650,277	62/650.277
2018-03-29	29-03-2018
PatentIn version 3.5	PatentIn versione 3.5
Artificial Sequence	Sequenza artificiale
Humanized Heavy Chain Variable Region	Regione variabile della catena pesante umanizzata
Humanized Light Chain Variable Region	Regione variabile della catena leggera umanizzata
Chimeric Heavy Chain Variable Region	Regione variabile della catena pesante chimerica
Chimeric Light Chain Variable Region	Regione variabile della catena leggera chimerica
Humanized Anti-PSMA Variant - Heavy Chain	Variante anti-PSMA umanizzata - Catena pesante
Humanized Anti-PSMA Variant - Light Chain	Variante anti-PSMA umanizzata - Catena leggera
Chimeric Anti-PSMA Antibody Variant - Heavy Chain	Variante di anticorpo anti-PSMA chimerico - Catena pesante
Chimeric Anti-PSMA Antibody Variant - Light Chain	Variante di anticorpo anti-PSMA chimerico - Catena leggera

LEGENDA – DISEGNI

FIGURE 1	FIGURA 1
Non-cleavable MMAF	MMAF non scindibile
Short Cleavable scindibile corta
Cleavable MMAF	MMAF scindibile
Time (h)	Tempo (h)
FIGURE 2	FIGURA 2
Time (h)	Tempo (h)
FIGURE 3	FIGURA 3
Analyte (ng/ml)	Analita (ng/ml)
Naked Antibody	Anticorpo nudo
Time (h)	Tempo (h)
FIGURE 4A	FIGURA 4A
Tumor Volume (mm ³)	Volume del tumore (mm ³)
Vehicle	Veicolo
Unconjugated mAb ...	mAb non coniugato ...
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 4B	FIGURA 4B
Body Weight Change (%)	Cambiamento del peso corporeo (%)
Vehicle	Veicolo
Unconjugated mAb ...	mAb non coniugato ...
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Time (Days)	Tempo (giorni)

FIGURE 5A	FIGURA 5A
Tumor Volume (mm ³)	Volume del tumore (mm ³)
Vehicle	Veicolo
Unconjugated mAb ...	mAb non coniugato ...
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 5B	FIGURA 5B
Body Weight Change (%)	Cambiamento del peso corporeo (%)
Vehicle	Veicolo
Unconjugated mAb ...	mAb non coniugato ...
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 6A	FIGURA 6A
Serum Concentration (µg/mL)	Concentrazione nel siero (µg/ml)
Non-tumor ...	Non tumore ...
Tumor ...	Tumore ...
Days	Giorni
FIGURE 6B	FIGURA 6B
Serum Concentration (µg/mL)	Concentrazione nel siero (µg/ml)
Days	Giorni
FIGURE 7A	FIGURA 7A
Tumor Volume (mm ³)	Volume del tumore (mm ³)
Controls	Controlli
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Enzalutamide ...	Enzalutammine ...

Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 7B	FIGURA 7B
Body Weight Change (%)	Cambiamento del peso corporeo (%)
Controls	Controlli
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Enzalutamide ...	Enzalutammide ...
Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 8A	FIGURA 8A
Tumor Volume (mm ³)	Volume del tumore (mm ³)
Vehicle	Veicolo
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Enzalutamide ...	Enzalutammide ...
Time (Days)	Tempo (giorni)
FIGURE 8B	FIGURA 8B
Body Weight Change (%)	Cambiamento del peso corporeo (%)
Vehicle	Veicolo
anti-PSMA-ADC ...	ADC anti-PSMA ...
Enzalutamide ...	Enzalutammide ...
Time (Days)	Tempo (giorni)

SEQUENCE LISTING

<110> Ambrx, Inc

<120> Novel Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Antibody Drug Conjugates

<130> AMBX-0225.00PCT

<150> 62/650,277

<151> 2018-03-29

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Heavy Chain Variable Region

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Light Chain Variable Region

<400> 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 3
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Light Chain Variable Region

<400> 3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Light Chain Variable Region

<400> 4

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Light Chain Variable Region

<400> 5

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 6
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric Heavy Chain Variable Region

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric Light Chain Variable Region

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Heavy Chain

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Light Chain

<400> 9

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Heavy Chain

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Light Chain

<400> 11

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Heavy Chain

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized Anti-PSMA Variant - Light Chain

<400> 13

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-PSMA Variant - Heavy Chain

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized Anti-PSMA Variant - Light Chain

<400> 15

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric Anti-PSMA Antibody Variant - Heavy Chain

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 17
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric Anti-PSMA Antibody Variant - Light Chain

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

FIGURE 1

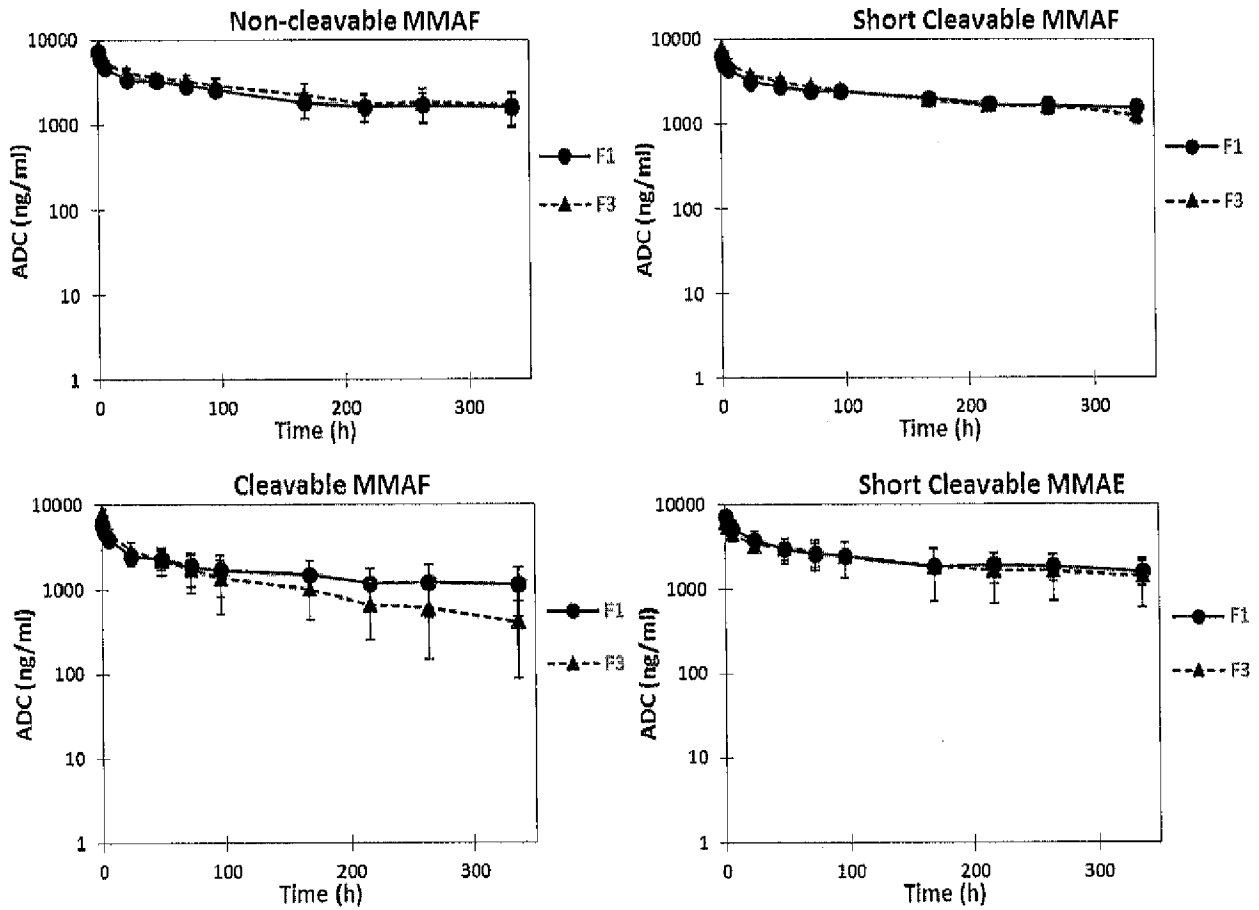


FIGURE 2

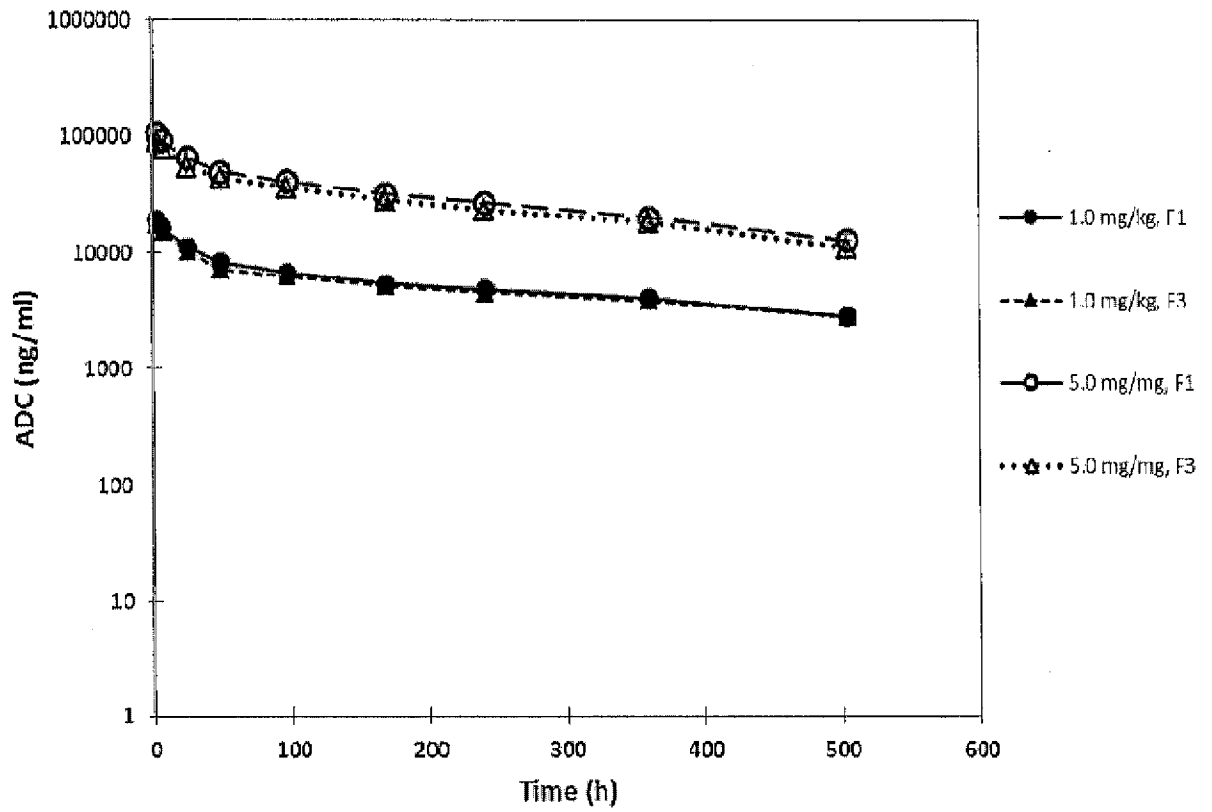


FIGURE 3

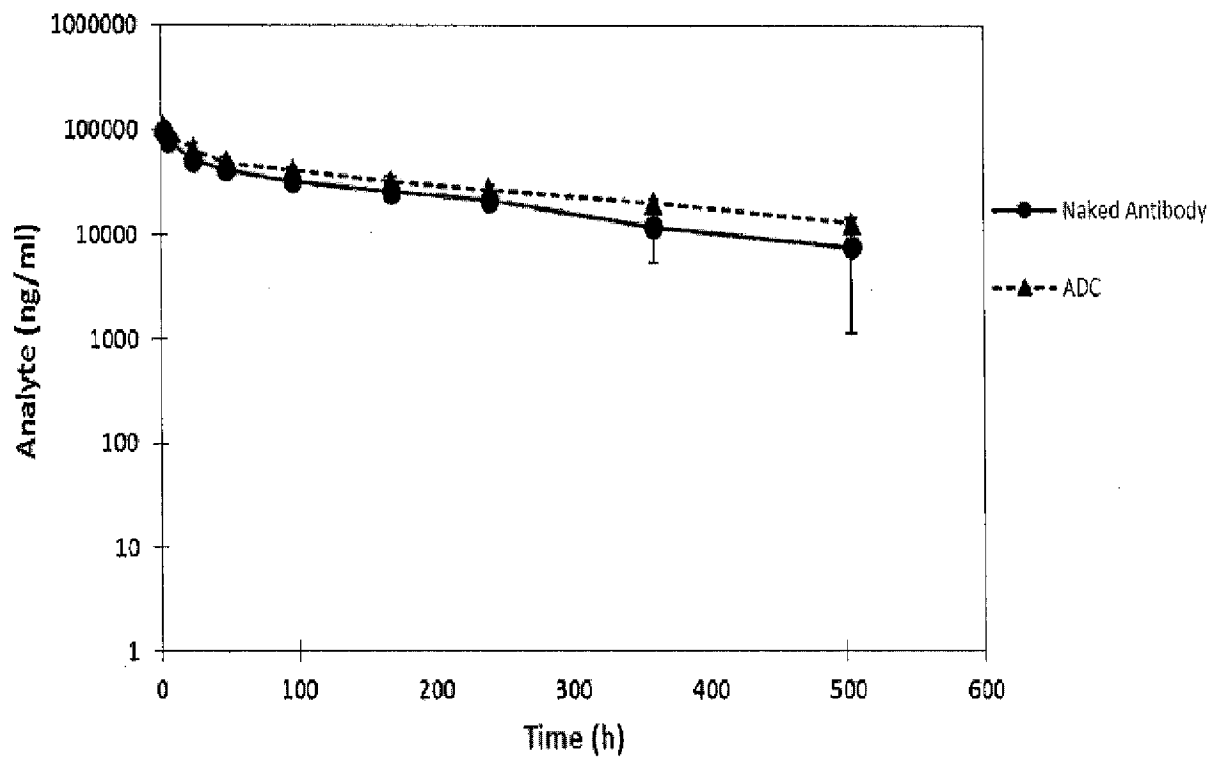


FIGURE 4A

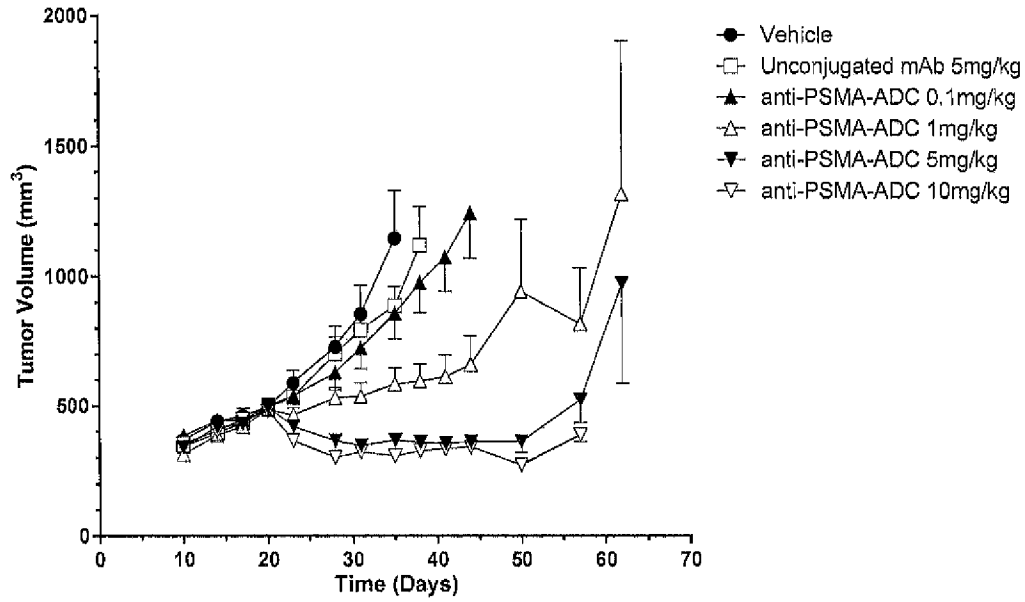


FIGURE 4B

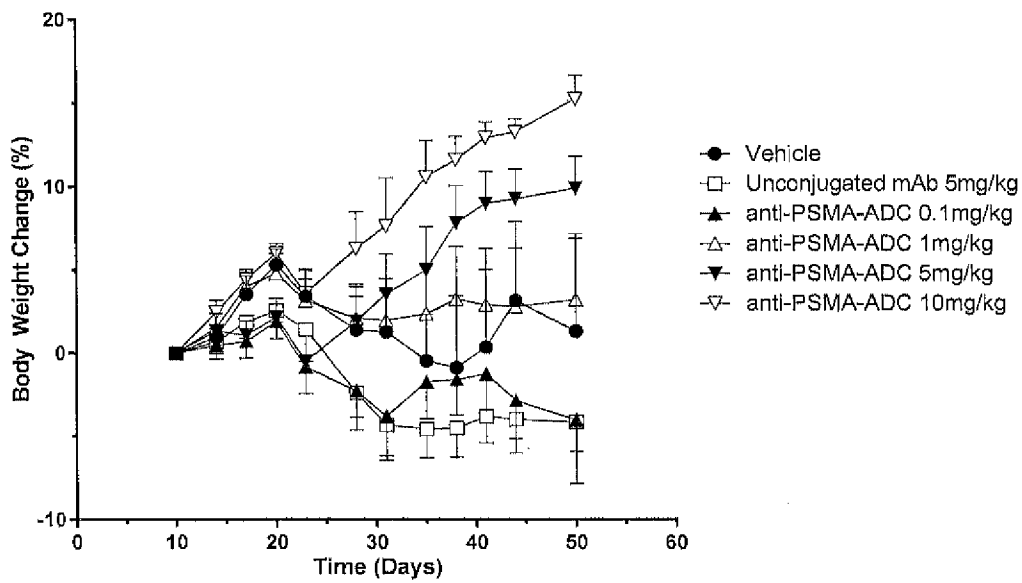


FIGURE 5A

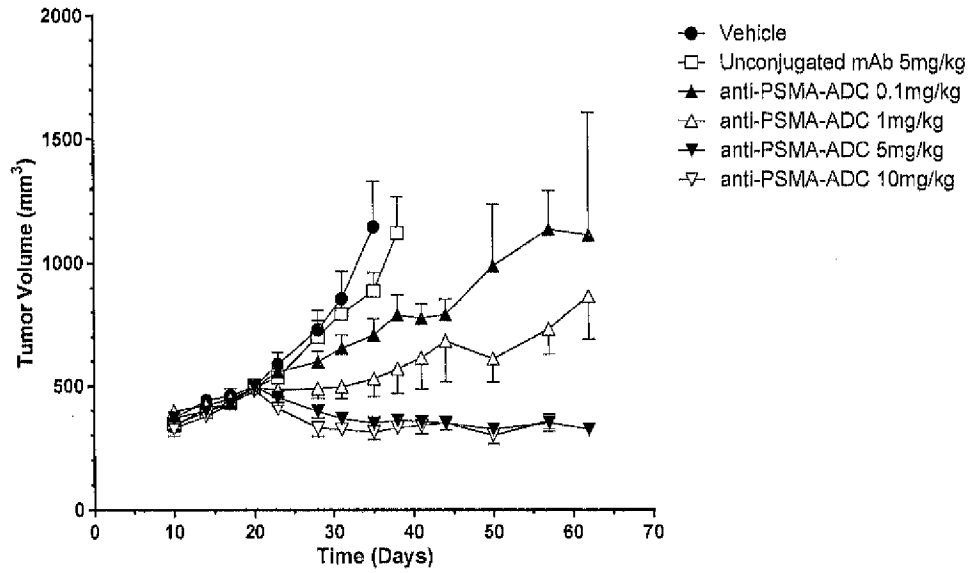


FIGURE 5B

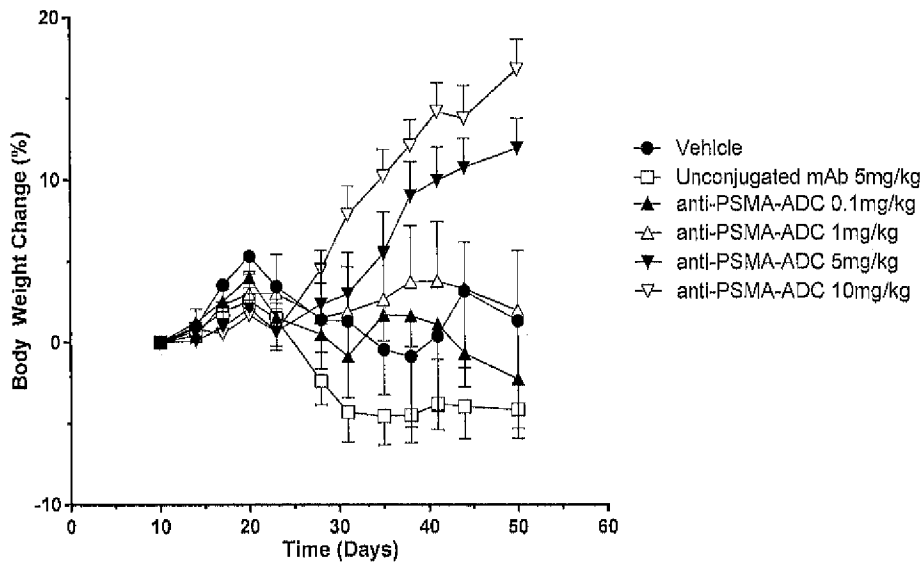


FIGURE 6A

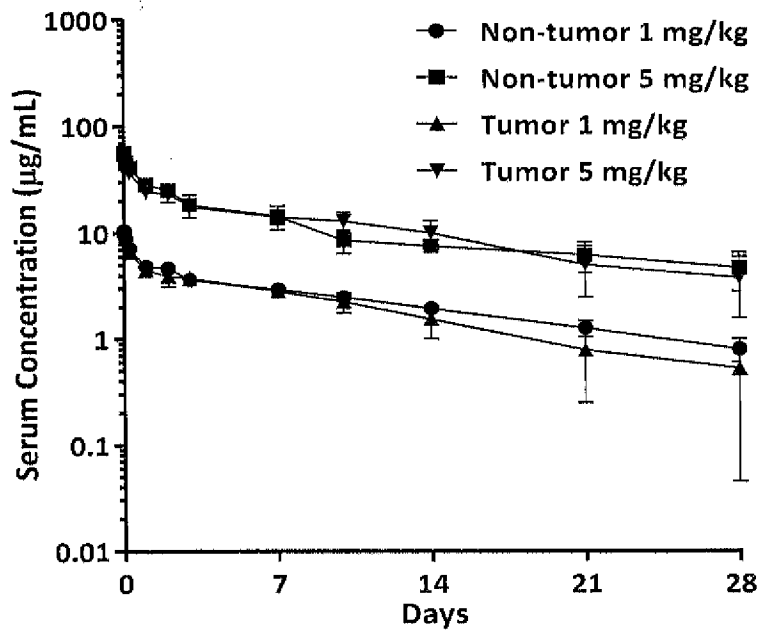


FIGURE 6B

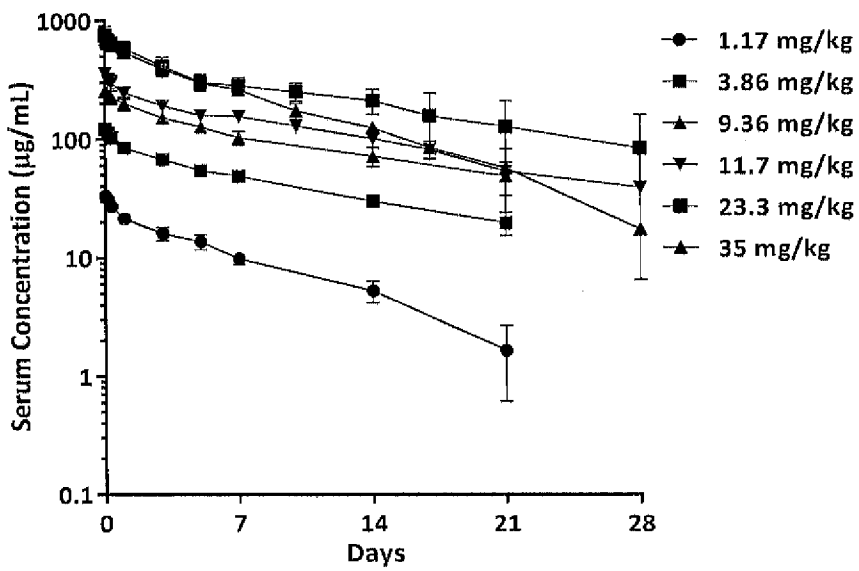


FIGURE 7A

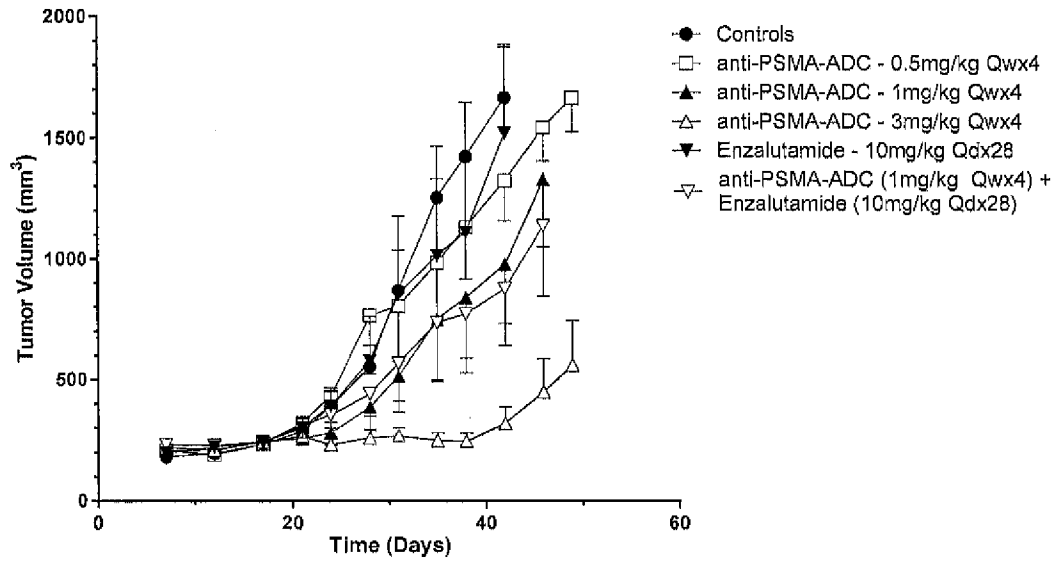


FIGURE 7B

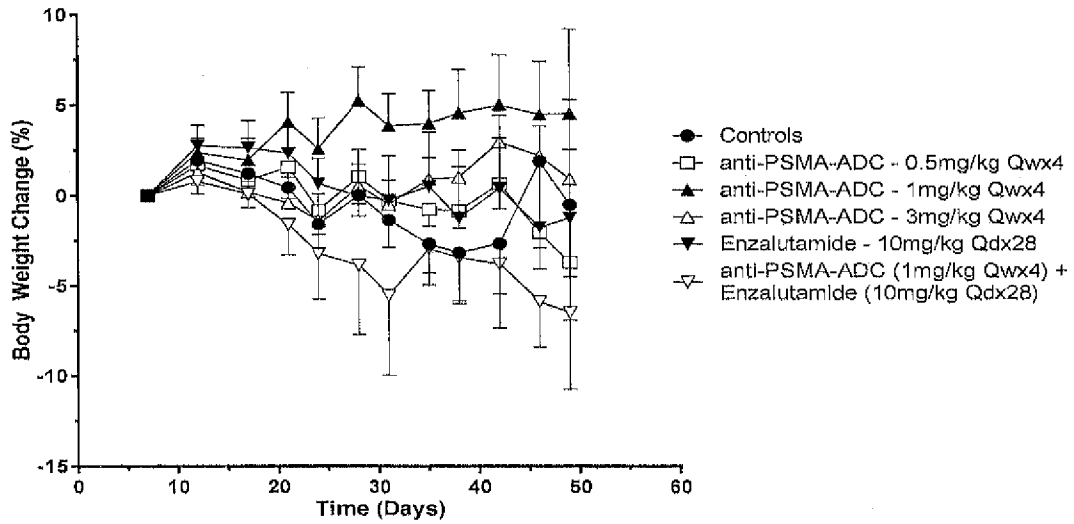


FIGURE 8A

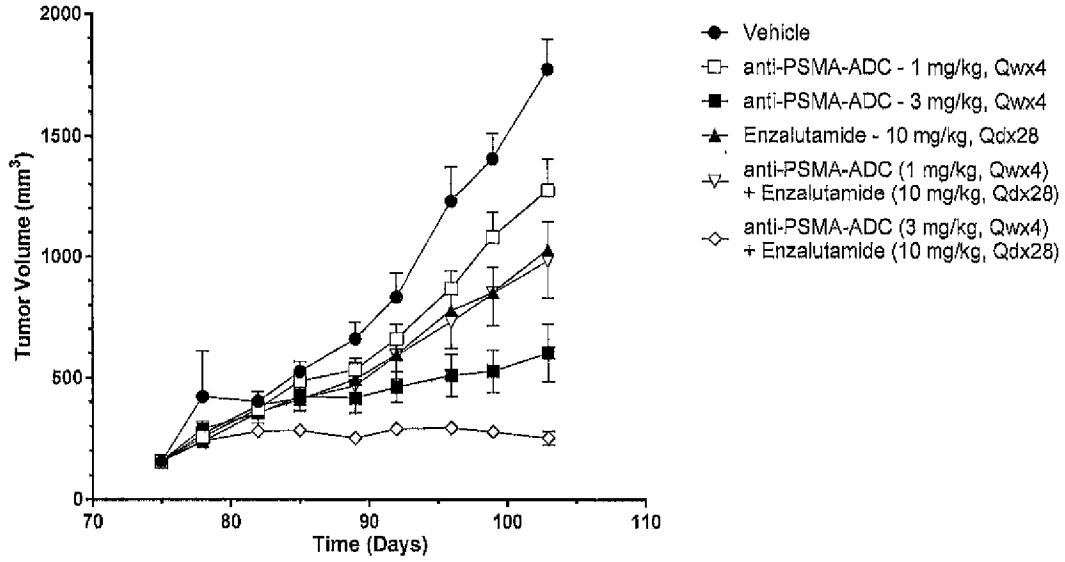


FIGURE 8B

