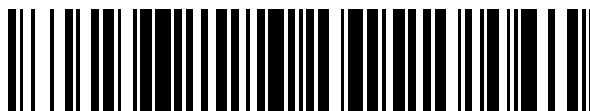


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 420**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14770731 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2968552**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos y de agentes de focalización usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783426 P

25.06.2013 US 201361839330 P

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

27.10.2020

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**KIM, CHANHYUK;
AXUP, JUN, Y.;
YUN, HWAYOUNG;
SCHULTZ, PETER, G.;
MA, JENNIFER;
SHEN, JIAYIN y
YANG, PENGYU**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 790 420 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpos y de agentes de focalización usos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] En este documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden uno o más aminoácidos no naturales, métodos para fabricar tales construcciones, composiciones farmacéuticas y medicamentos que comprenden tales construcciones y métodos para usar tales construcciones y composiciones para prevenir, inhibir y/o tratar una enfermedad o afección en un sujeto.

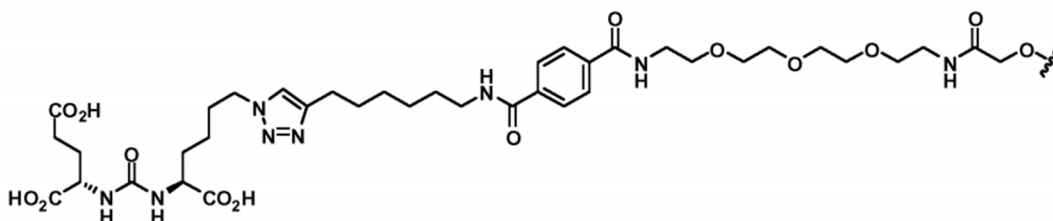
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Los anticuerpos son proteínas naturales que forma el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a sustancias extrañas (antígenos), principalmente para la defensa contra la infección. Durante más de un siglo, se han inducido anticuerpos en animales en condiciones artificiales y se han cosechado para su uso en terapia o diagnóstico de enfermedades, o para investigación biológica. Cada célula productora de anticuerpos individual produce un solo tipo de anticuerpo con una composición químicamente definida, sin embargo, los anticuerpos obtenidos directamente del suero animal en respuesta a la inoculación de antígeno en realidad comprenden un conjunto de moléculas no idénticas (p. ej., anticuerpos policlonales) hechas de un conjunto de células productoras de anticuerpos individuales.

20 [0003] Algunos conjugados de anticuerpos, como los anticuerpos biespecíficos, pueden unirse a dos o más antígenos diferentes. Se han desarrollado una serie de estrategias recombinantes para sintetizar anticuerpos biespecíficos, que incluyen formatos derivados de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) como diacuerpos, diacuerpos en tándem, BiTes (activador de células T biespecíficas) y DART (redireccionamiento de doble afinidad), así como formatos basados en inmunoglobulina G (IgG) como Triomab, DVD-Ig (anticuerpos de dominio variable dual) y anticuerpos dos en uno. Sin embargo, los anticuerpos biespecíficos pueden tener propiedades farmacocinéticas y físicas deficientes, como la inmunogenicidad y los desafíos de fabricación. Por lo tanto, existe la necesidad de una mejora o alternativa a dicha tecnología existente. Además, es deseable un control preciso sobre la geometría en tal resto de direccionamiento porque la geometría puede alterar la afinidad y la especificidad de unión. En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización, y métodos para producir tales conjugados, con geometrías específicas para una eficacia terapéutica óptima y especificidad de la diana mediante el acoplamiento específico de sitio de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un agente de focalización. Thompson et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications 366 (2008 526-531) describe la construcción y ensayo *in vitro* de un anticuerpo inmunoregular anti-tumoral foto-activable. Schraa et al. (International Journal of Cancer, 112, 279-285 (2004)) describe péptidos RGD monocíclicos (cRDGfK) acoplados covalentemente a un anticuerpo monoclonal anti-CD3 con diferentes relaciones péptido: proteína. Liu et al. (Science, Vol. 239, N° 4838 (1988), pp. 395-398) describe un conjugado de anticuerpo hormonal que consiste de un análogo de hormona estimuladora de melanocitos acoplado a un anticuerpo monoclonal.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

45 [0004] La invención proporciona un conjugado de anticuerpo de agente de focalización: (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un correceptor de células T CD3, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un aminoácido no natural y (b) un compuesto de Fórmula XI que se une a la célula diana:



55 (Fórmula XI);

60 en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al correceptor de células T CD3 no se une a la célula diana; en donde el compuesto de la Fórmula XI está conectado al aminoácido no natural.

65 [0005] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden: un agente de focalización que se une a una célula diana, en donde el agente de focalización no es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no se une a la célula diana; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores y en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno en una célula efectora citotóxica. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El agente de

focalización puede estar unido específicamente al sitio por uno o más enlazadores al uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

5 **[0006]** El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede ser de Fórmula I: X-L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde: X comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo; L1 comprende uno o más enlazadores; e Y comprende el agente de focalización.

10 **[0007]** Al menos una porción del anticuerpo puede basarse o derivarse de un anticuerpo humano, humanizado, diseñado por humanos o completamente humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a un antígeno en una célula efectora citotóxica y el agente de focalización se une a una proteína de la superficie celular o un marcador de la superficie celular en una célula diana. La célula efectora citotóxica puede ser capaz de montar una respuesta inmune. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse al menos a una porción de un receptor en la célula efectora citotóxica. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse al menos a una porción de un correceptor en la célula efectora citotóxica. El receptor puede ser un receptor de células T (TCR). El correceptor puede comprender un correceptor de células T. El correceptor puede ser un correceptor de células T CD3. La célula efectora citotóxica puede ser una célula hematopoyética. La célula hematopoyética se puede seleccionar de un macrófago, un neutrófilo, un eosinófilo, una célula asesina natural, una célula B o una célula T. La célula efectora citotóxica puede ser una célula T citotóxica. El fragmento de anticuerpo puede comprender un fragmento Fab. El fragmento Fab puede comprender un fragmento Fab anti-CD3. El fragmento Fab anti-CD3 puede ser UCHT1. El fragmento de anticuerpo puede estar codificado por una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1 y 2.

25 **[0008]** El agente de focalización puede seleccionarse de una molécula pequeña, una molécula de focalización a células, un ligando, una proteína, un péptido, un peptoide, un aptámero de ADN, un ácido nucleico peptídico, una vitamina, un sustrato o un análogo de sustrato. El agente de focalización puede no comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. La proteína de la superficie celular o el marcador de la superficie celular pueden seleccionarse de un antígeno, un receptor, un correceptor, una proteína transmembrana o un marcador celular en la célula diana. La proteína de la superficie celular puede seleccionarse de un receptor de colecistoquinina B, un receptor de hormona liberadora de gonadotropina, un receptor de somatostatina 2, una integrina avb3, un receptor de péptido liberador de gastrina, un receptor de neuroquinina 1, un receptor de melanocortina 1, un receptor de neurotensina, receptor de neuropéptido Y y lectina de tipo C como molécula 1. El antígeno puede comprender un antígeno de membrana específico de próstata. El agente de focalización puede comprender un octreótido. El agente de focalización puede comprender un octreotato. El agente de focalización puede comprender un análogo de somatostatina. El agente de focalización puede comprender un inhibidor de la glucosidasa CD38 NAD⁺. El agente de focalización puede comprender una pentagastrina. El agente de focalización puede comprender una hormona liberadora de gonadotropina. El agente de focalización puede comprender un antagonista de CCKB. El agente de focalización puede comprender un cRGD. El agente de focalización puede comprender una bombesina. El agente de focalización puede comprender 2-[3-(1,3-dicarboxipropilo)ureidol]ácido pentanodioico (DUPA). El agente de focalización puede ser lo suficientemente pequeño como para penetrar en un tumor. El agente de focalización puede estar codificado por una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además un segundo agente de focalización. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender 1, 2, 3, 4 o más agentes de dirección.

45 **[0009]** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a un antígeno en una célula efectora citotóxica y el agente de focalización puede unirse a una proteína de superficie celular o un marcador de superficie celular en una célula diana. La célula diana puede ser una célula cancerosa. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de próstata. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer epitelial. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de mama. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de riñón. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de pulmón. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de colon. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer colorrectal. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer gástrico. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer cerebral. La célula cancerosa puede derivarse de un glioblastoma. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer pancreático. La célula cancerosa puede derivarse de una leucemia mieloide. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer cervical. La célula cancerosa puede derivarse de un carcinoma medular de tiroides. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de ovario estromal. La célula cancerosa puede derivarse de un astrocitoma. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer endometrial. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer neuroendocrino. La célula cancerosa puede derivarse de un tumor gastroenteropancreático. La célula cancerosa puede derivarse de un linfoma no Hodgkin. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer pancreático exocrino. La célula cancerosa puede derivarse del sarcoma de Ewing. La célula cancerosa puede derivarse de un cáncer de piel. El cáncer de piel puede ser un melanoma. El cáncer de piel puede ser un cáncer de piel neoangiogénico. El cáncer de pulmón puede ser un cáncer de pulmón de células pequeñas. X puede estar acoplado a L1. Y puede estar acoplado a L1. X puede estar acoplado a L1 por una oxima. Y puede estar acoplado a L1 por una oxima. X puede estar acoplado a L1 por un enlace covalente, enlace iónico o enlace no covalente. Y puede estar acoplado a L1 por un enlace covalente, enlace iónico o enlace no covalente. L1 puede proporcionar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 angstrom (Å) distancia entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o menor a aproximadamente 50 angstrom (Å) entre X e Y. L1 puede proporcionar igual o menor a

aproximadamente 45 angstrom (Å) distancia entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o inferior a aproximadamente 40 angstrom (Å) entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o inferior a aproximadamente 30 angstrom (Å) entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o mayor a aproximadamente 5 angstrom (Å) entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o mayor a aproximadamente 10 angstrom (Å) entre X e Y. L1 puede proporcionar igual o mayor a aproximadamente 15 angstrom (Å) distancia entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia igual o mayor a aproximadamente 20 angstrom (Å) distancia entre X e Y. L1 puede proporcionar una distancia entre X e Y incluyendo y entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 angstrom (Å).

[0010] El uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprenden una p-acetilfenilalanina (pAcF). El uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprenden una selenocisteína. El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender (a) diversos análogos de tirosina y fenilalanina sustituidos tales como *O*-metilo-1-tirosina, *p*-amino-1-fenilalanina, 3-nitro-1-tirosina, *p*-nitro-1-fenilalanina, *m*-metoxi-1-fenilalanina y *p*-isopropilo-1-fenilalanina; (b) aminoácidos con arilo azida y grupos de benzofenona que pueden estar foto-reticulados; (c) aminoácidos que tienen una reactividad química única que incluye acetilo-1-fenilalanina y *m*-acetilo-1-fenilalanina, *O*-arilo-1-tirosina, *O*-(2-propinilo)-1-tirosina, *p*-etiltiliocarbonilo-1-fenilalanina y *p*-(3-oxobutanoilo)-1-fenilalanina; (d) aminoácidos que contienen átomos pesados para la fase en la cristalografía de rayos X que incluyen *p*-yodo y *p*-bromo-1-fenilalanina; (e) el aminoácido activo redox dihidroxi-1-fenilalanina; (f) aminoácidos glicosilados que incluyen b-N-acetilglucosamina-*O*-serina y a-N-acetilgalactosamina-*O*-treonina; (g) aminoácidos fluorescentes con cadenas laterales de naftilo, dansilo y 7-aminocoumarina; (h) aminoácidos fotoclavables y fotoisomerizables con cadenas laterales azobenceno y nitrobencilo Cys, Ser y Tyr; (i) la fosfotirosina mimética p-carboximetilo-1-fenilalanina; (j) el homólogo de glutamina homoglutamina; (k) ácido 2-aminooctanoico; (l) o una combinación de (a)-(k). El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender al menos un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo, hidroxilamina, ciclooctino, arilo/alquilo azidas, norborneno, ciclopropeno, transcicloocteno y tetrazina. El uno o más aminoácidos no naturales pueden estar genéticamente codificados. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporar específicamente el sitio al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender dos o más aminoácidos no naturales. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender tres o más aminoácidos no naturales. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender cuatro o más aminoácidos no naturales. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar un residuo de aminoácido en una cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo reemplazan un residuo de aminoácido en una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo reemplazan un residuo de aminoácido en una región variable del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0011] Se describen adicionalmente en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden un agente conjugado de anticuerpo dirigido que comprende: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un agente de focalización, en donde el agente de focalización no es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. La composición farmacéutica puede comprender además un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

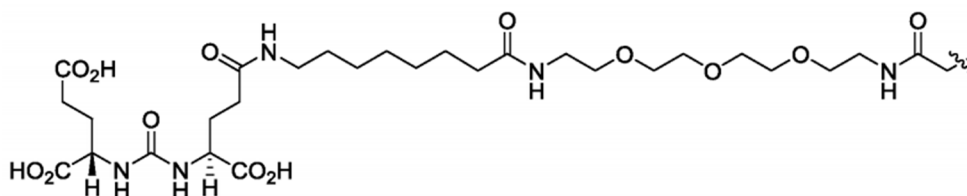
[0012] En el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un agente conjugado de anticuerpo dirigido que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un agente de focalización, en donde el agente de focalización no es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. La enfermedad o afección puede ser una infección patogénica. La infección patogénica puede ser una infección bacteriana. La infección patogénica puede ser una infección viral. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad inflamatoria. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmune. La enfermedad autoinmune puede ser diabetes. La enfermedad o afección puede ser un cáncer. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de próstata. La enfermedad o afección puede ser un cáncer epitelial. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de riñón. La enfermedad o afección puede ser cáncer de pulmón. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de colon. La enfermedad o afección puede ser un cáncer colorrectal. La enfermedad o afección puede ser un cáncer gástrico. La enfermedad o afección puede ser un cáncer cerebral. La enfermedad o afección puede ser un glioblastoma. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de páncreas. La enfermedad o afección puede ser una leucemia mieloide. La enfermedad o afección puede ser un cáncer cervical. La enfermedad o afección puede ser un carcinoma medular de tiroides. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de seno. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de ovario. La enfermedad o afección puede ser un astrocitoma. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de endometrio. La enfermedad o afección puede ser un cáncer neuroendocrino. La enfermedad o afección puede ser un tumor gastroenteropancreático. La enfermedad o afección

puede ser un linfoma no Hodgkin. La enfermedad o afección puede ser un cáncer pancreático exocrino. La enfermedad o afección puede ser un sarcoma de Ewing. La enfermedad o afección puede ser un cáncer de piel. El cáncer de piel puede ser un melanoma. El cáncer de piel puede ser un cáncer de piel neoangiogénico. El cáncer de pulmón puede ser un cáncer de pulmón de células pequeñas. La administración de la composición farmacéutica o conjugada de anticuerpo del agente de focalización puede comprender una administración intravenosa, una administración subcutánea, una administración intraperitoneal, una administración intramuscular, una administración intravascular, una administración intratecal, una administración intravítrea, una administración tópica o una infusión. La administración puede comprender la administración oral. La administración puede comprender la administración intranasal. La administración puede comprender el uso de un dispositivo de microagujas.

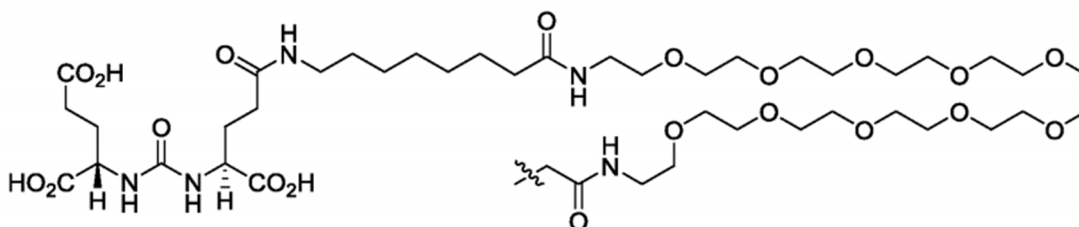
[0013] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; una o más moléculas DUPA; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido a la una o más moléculas DUPA por el uno o más enlazadores. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio a la una o más moléculas DUPA por el uno o más enlazadores. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar unido a una o más moléculas DUPA por uno o más enlazadores a uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar unido alternativamente a la una o más moléculas DUPA por el uno o más enlazadores a un aminoácido natural. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un Fab anti-CD3.

[0014] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden: un Fab anti-CD3; una o más moléculas DUPA; y uno o más enlazadores, en donde el Fab anti-CD3 está unido a la una o más moléculas DUPA por uno o más enlazadores. El Fab anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar un aminoácido natural del Fab anti-CD3. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar un aminoácido natural del Fab anti-CD3, en donde el aminoácido natural se selecciona de la Lisina 138 (Lys 138) de una cadena pesada del Fab anti-CD3, Alanina 123 (Ala 123) de una cadena pesada del Fab anti-CD3, Treonina 109 (Thr 109) de una cadena pesada del Fab anti-CD3 y Serina 202 (Ser²⁰²) de una cadena pesada del Fab anti-CD3. Una primera molécula de DUPA y una segunda molécula de DUPA pueden estar unidas específicamente a un primer aminoácido no natural y un segundo aminoácido no natural del Fab anti-CD3, un primer enlazador y un segundo enlazador. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede ser de Fórmula I: X-1-Y o Fórmula IA: Y-1-X, en donde: X comprende el Fab anti-CD3; L comprende el uno o más enlazadores; e Y comprende una o más moléculas DUPA.

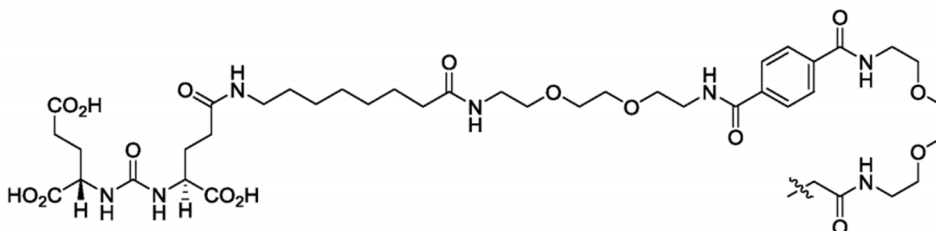
[0015] El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un compuesto seleccionado de Fórmula V Fórmula VI, Fórmula VII o Fórmula VIII:



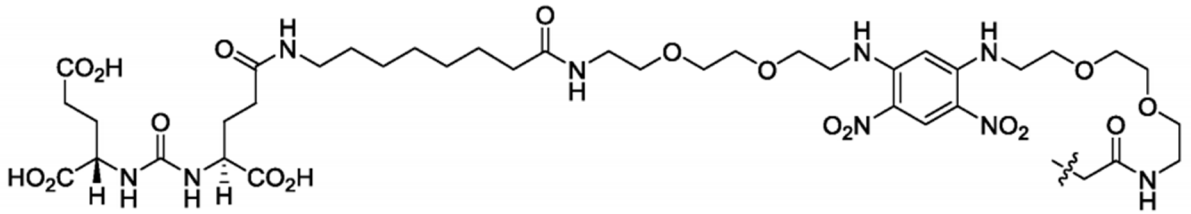
(Fórmula V),



(Fórmula VI),

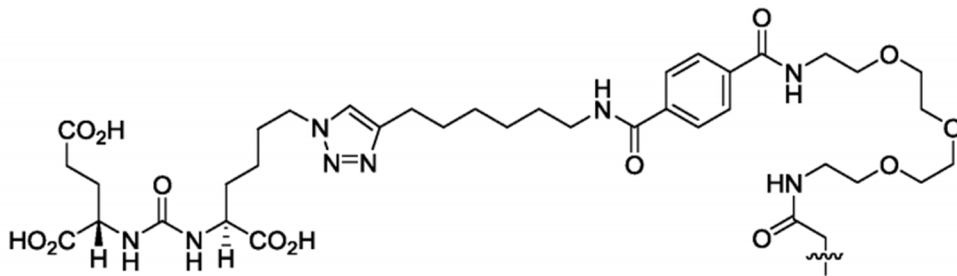


(Fórmula VII), y



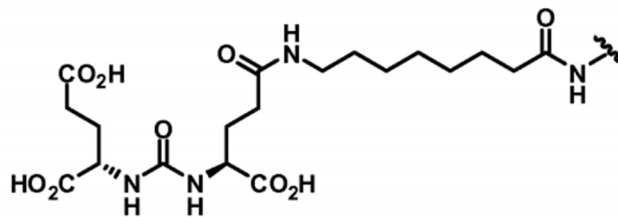
(Fórmula VIII).

[0016] El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un compuesto de Fórmula IX:



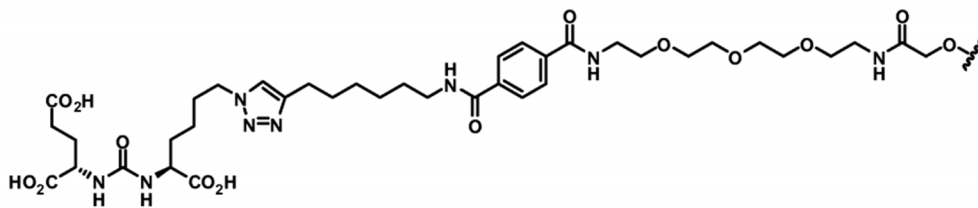
(Formula IX).

[0017] El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un compuesto de Fórmula X:



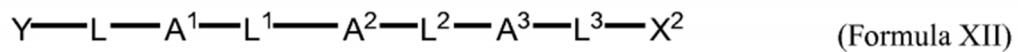
(Formula X).

[0018] El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un compuesto de Fórmula XI:



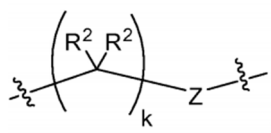
(Formula XI).

[0019] En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan compuestos de Fórmula XII:



en donde

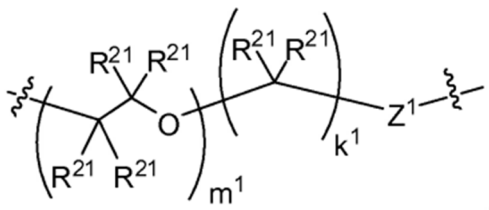
Y es un ligando de antígeno de membrana específica de próstata (PSMA);
L es



A¹ se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un heteroarilo de 5 a 6 miembros, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;

L¹ es

5



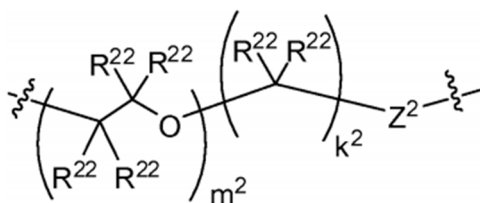
;

A² se selecciona del grupo que consiste de un Enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;

L² es

15

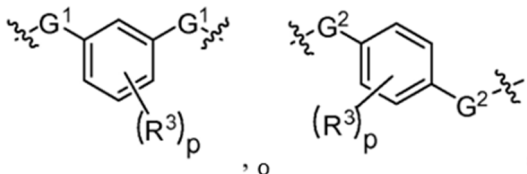
20



25

A es un enlace

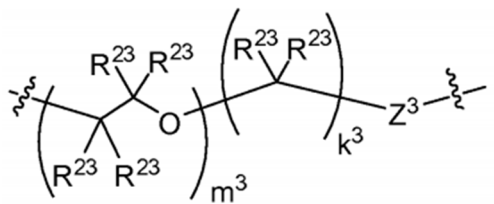
30



35

L³ es

40



45

X² es un enlazador unido a un grupo funcional que reacciona con un aminoácido o un enlazador unido a un aminoácido modificado,

en donde el aminoácido modificado es parte de X, en donde X es un péptido, proteína o anticuerpo terapéutico modificado;

cada R¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, o haloalquilo;

cada R², R²¹, R²² y R²³ se selecciona independientemente de H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo;

cada R³ se selecciona independientemente de halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo, -NO₂, y NR¹R¹;

cada G¹ y G² se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)- y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;

cada Z, Z¹, Z² y Z³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O- y -N(R¹)-;

k, k¹, k² y k³ se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

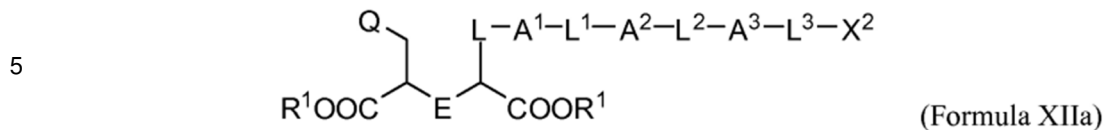
m¹, m² y m³ se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y

p es 0, 1, 2, 3 o 4;

o un estereoisómero del mismo.

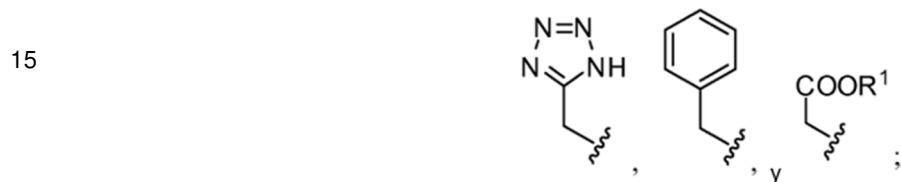
[0020] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el

compuesto es de Fórmula XIIa:



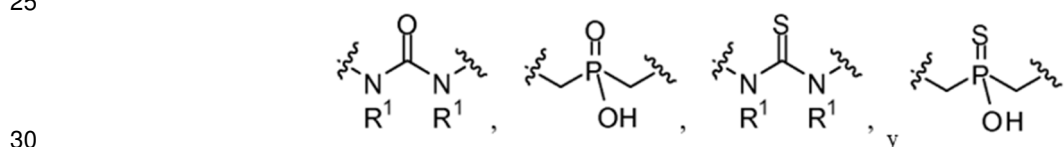
en donde:

Q se selecciona del grupo que consiste en:

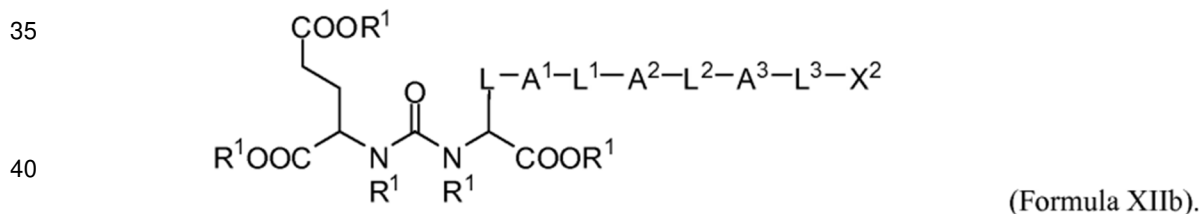


y

E se selecciona del grupo que consiste en:

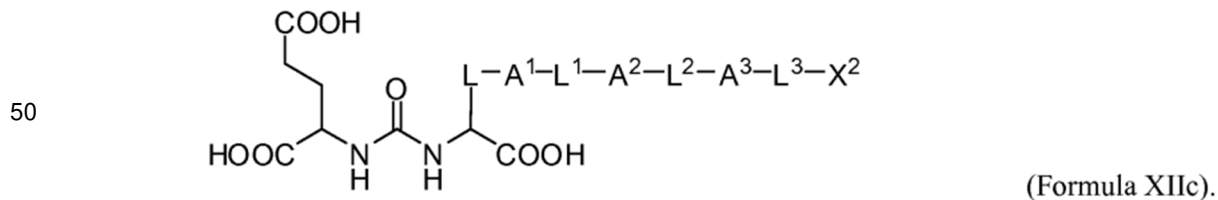


[0021] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIb:

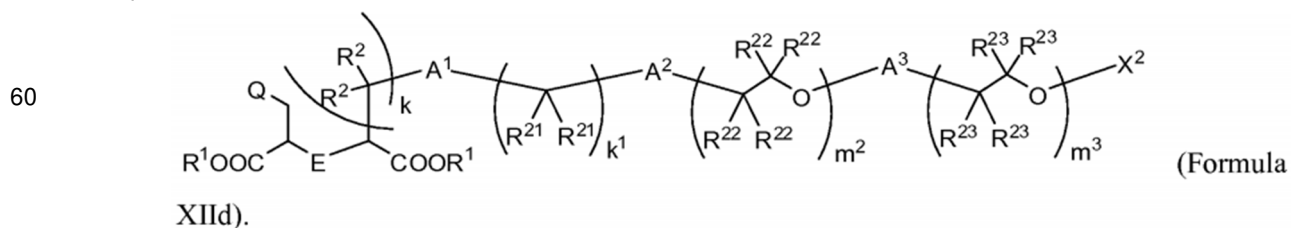


En

realizaciones adicionales descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIc:

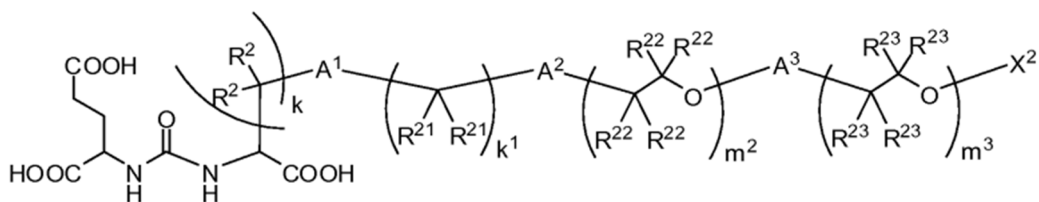


[0022] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIId:



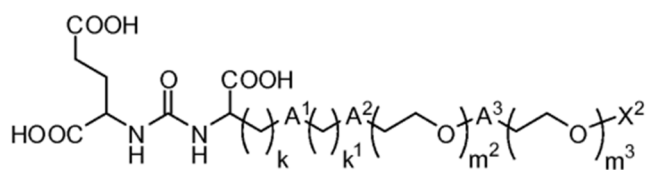
65

En realizaciones adicionales descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIle:



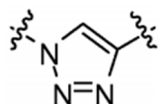
(Formula XIle).

En otras realizaciones adicionales descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIf:

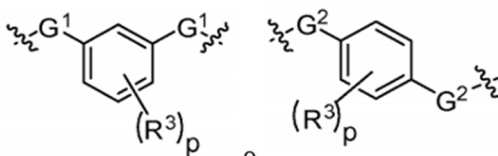


(Formula XIIf).

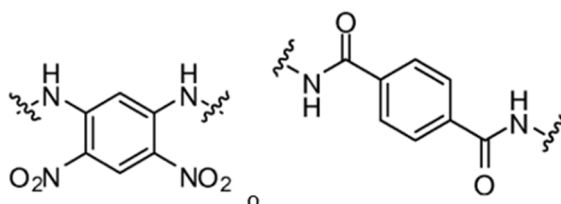
[0023] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es -C(O)N(H)-. En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es



[0024] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A³ es



En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A³ es



[0025] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada R², R²¹, R²², R²³ y R²⁴ se seleccionan independientemente de H, F, -CH₃ o -CF₃. En algunas realizaciones descritas arriba o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada R², R²¹, R²², R²³ y R²⁴ es H.

[0026] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es

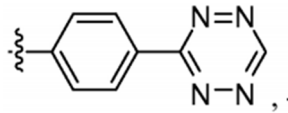


en donde:

A⁴ se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)- y -N(R¹)S(O)_{1,2}-; cada R²⁴ se selecciona independientemente entre H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo; k⁴ se selecciona entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; Z⁴ se selecciona de un enlace, arilo y un heteroarilo de 5 a 6 miembros; y X¹ es -ONH₂,

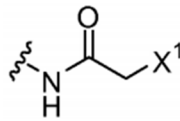


-N₃,

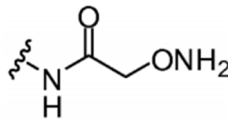


-N(H)NH₂, o -SH.

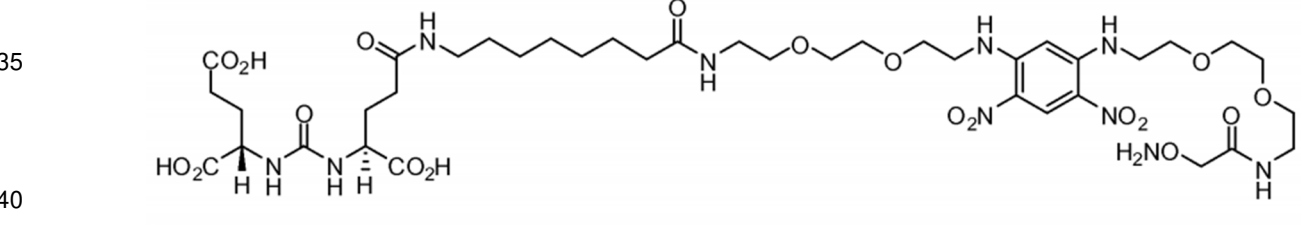
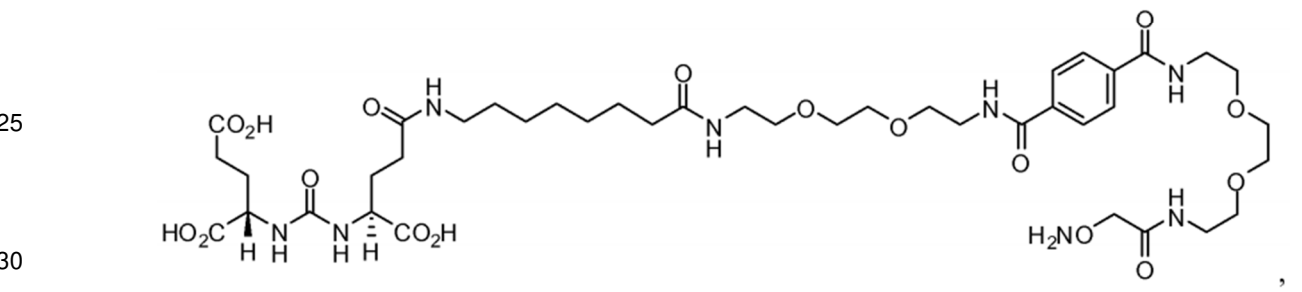
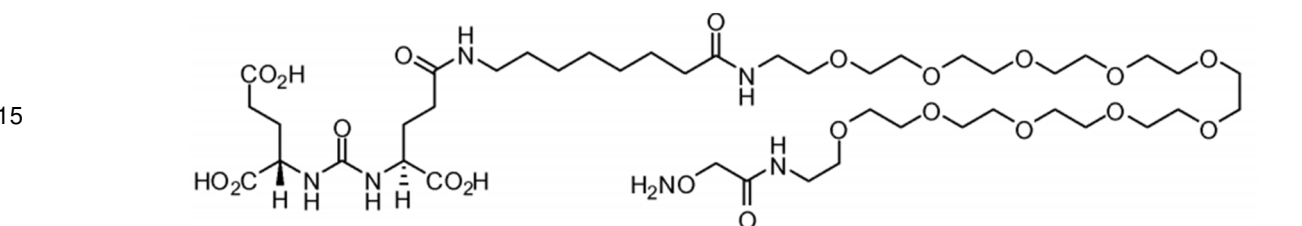
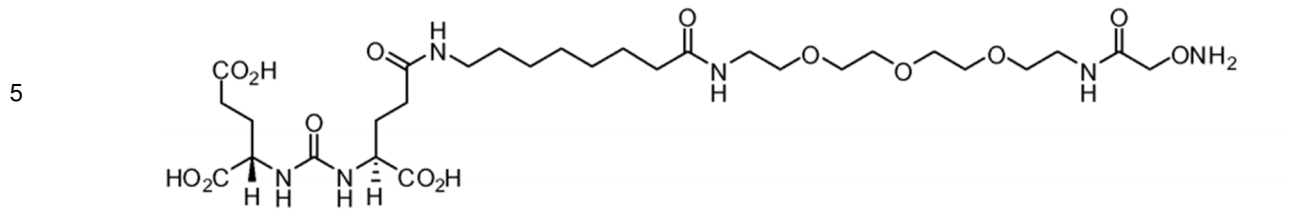
[0027] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es



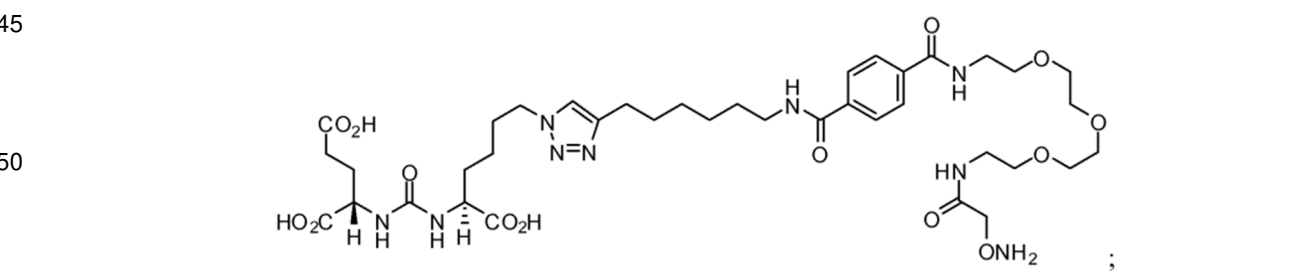
En otras formas de realización descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es



[0028] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de una compuesto de Fórmula XII, el compuesto se selecciona de:

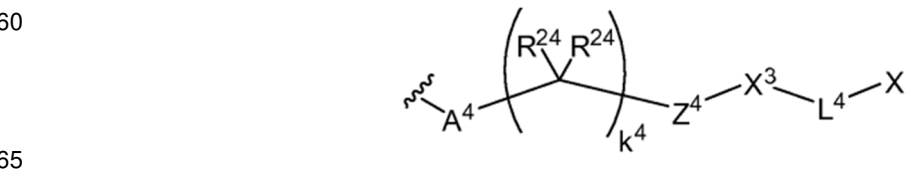


y



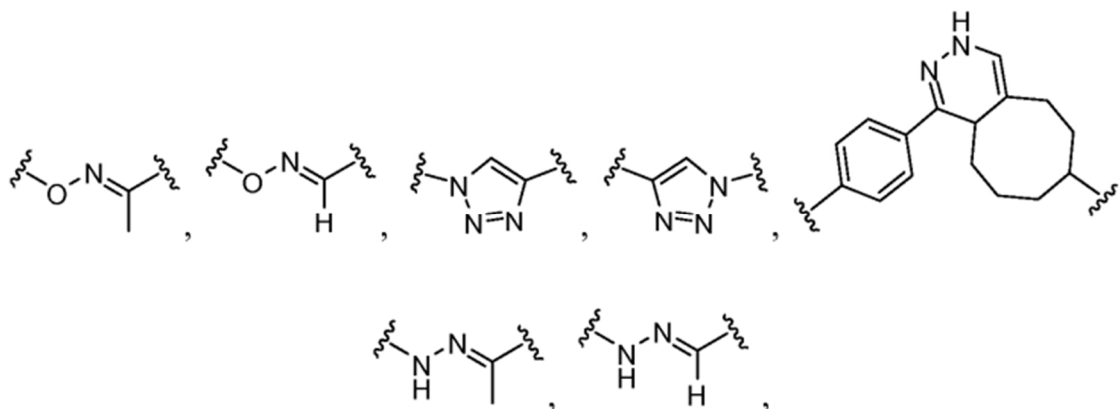
o un estereoisómero del mismo.

[0029] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es



en donde:

A⁴ se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)- y -N(R¹)S(O)_{1,2}-; cada R²⁴ se selecciona independientemente entre H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo;
 k⁴ se selecciona entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
 Z⁴ se selecciona de un enlace, arilo y un heteroarilo de 5 a 6 miembros; y
 X³ es



o -S-;

X es un péptido, proteína o anticuerpo terapéutico modificado;

L⁴ es un enlace directamente unido a un aminoácido modificado, o un enlazador unido a un aminoácido modificado, en donde el aminoácido modificado es parte de X.

En algunas realizaciones descritas arriba o abajo de un compuesto de Fórmula XII, el aminoácido es un aminoácido no natural.

[0030] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, k es 1, 2, o 3; y Z es un enlace.

[0031] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es -C(O)N(R¹)-, arilo de 6 miembros, o heteroarilo de 5 miembros.

[0032] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m¹ es 0; k¹ es 6 o 7; y Z¹ es un enlace.

[0033] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es un enlace; m² y k² son 0; y Z² es un enlace.

[0034] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es -C(O)N(H)-; m² es 2; k² es 2; y Z² es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es -C(O)N(H)-; m² es 3; k² es 2; y Z² es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es -C(O)N(H)-; m² es 10; k² es 2; y Z² es un enlace.

[0035] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, R³ es -NO₂; y p es 2.

[0036] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada GX¹ y GX² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -N(H)-, -C(O)N(H)-, y -N(H)C(O)-.

[0037] De algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m³ es 3; k³ es 2; y Z³ es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m³ es 2; k³ es 2; y Z³ es un enlace.

[0038] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A³ es un enlace; m³ y k³ son 0; y Z³ es un enlace.

[0039] También se describe en el presente documento son composiciones que comprenden un conjugado de anticuerpo de agente de focalización que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización en donde la pureza del conjugado de anticuerpo del agente de focalización o el compuesto es al menos 90%. La construcción del anticuerpo del agente de focalización puede comprender un aminoácido no

natural. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio.

[0040] También se describe en el presente documento son compuestos que comprenden una Fórmula seleccionada entre las Fórmulas XII o XIIa-f, en donde la pureza del compuesto es de al menos 90%.

[0041] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una primera célula; y el agente de focalización se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una segunda célula.

[0042] También se describe en el presente documento conjugados de anticuerpos de agente de focalización que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una primera célula; el agente de focalización se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una segunda célula; y uno o más enlazadores enlazan el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización específicamente para el sitio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0043] El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la divulgación, se puede entender mejor cuando se lea en conjunción con las figuras adjuntas. Con el fin de ilustrar la divulgación, se muestran en las figuras realizaciones que se prefieren actualmente. Sin embargo, debe entenderse que la divulgación no se limita a los arreglos, ejemplos e instrumentos precisos mostrados.

[0044] La invención puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea en conjunción con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se expanden o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

FIG. 1 representa un esquema para sintetizar un compuesto de enlace a agente de focalización de unión a PSMA.

FIG. 2 representa un diagrama de cinta de un fragmento UCHT1-Fab.

FIG. 3A representa un esquema para unir un compuesto de enlace a agente de focalización de unión a PSMA a un fragmento Fab conjugado con enlazador.

FIG. 3B-3E muestra ejemplos de enlazadores.

FIG. 4A y 4C representan el análisis ESI-MS de fragmentos Fab antes y después de la conjugación del enlazador.

FIG. 4B y 4D representan un espectro de masa desconvolucionado de fragmentos Fab antes y después de la conjugación del enlazador.

FIG. 5A-5B representa el análisis de citometría de flujo de células Jurkat (FIG. 5A) y células C4-2 (FIG. 5B) incubadas con conjugados de anticuerpos del agente de focalización.

FIG. 5C representa el ensayo de unión basado en FACS de diferentes Fab a células C4-2.

FIG. 6A representa la fluorescencia relativa de células C4-2 tratadas con diferentes concentraciones de Fabs conjugados y no conjugados en células C4-2.

FIG. 6B representa el porcentaje de citotoxicidad de las células C4-2 o DU145 incubadas con doble Phthal o una mezcla.

FIG. 6C representa los niveles de TNF-alfa de citocina proinflamatoria en el sobrenadante del ensayo de citotoxicidad. Las señales de TNF-alfa dependientes de la dosis se detectaron solo en presencia de células C4-2 positivas para PSMA mediante ensayo ELISA (sistemas de I + D).

FIG. 7A representa un esquema de un experimento de modelo de xenoinjerto *in vivo*.

FIG. 7B representa el volumen tumoral de células C4-2 implantadas en ratones tratados con PBS, Fab conjugado y PBMC, o Fab conjugado (sin PBMC).

FIG. 8 representa la estructura de p-acetilfenilalina.

FIG. 9 representa el análisis FACS de alto rendimiento de la unión de diferentes conjugados de P-anti-CD3 a células C4-2 positivas para PSMA a diversas concentraciones. El conjugado doble P-Phthal muestra una afinidad significativamente mejorada en comparación con los monoconjugados correspondientes.

FIG. 10 representa la citotoxicidad *in vitro* de células diana en presencia de hPBMC inactivadas recientemente purificadas (T: E = 1:10). Los conjugados muestran actividad dependiente de la dosis en células C4-2 positivas para PSMA con diferentes valores de CE₅₀, mientras que la mezcla no conjugada no muestra actividad.

FIG. 11 representa imágenes de microscopio de los pocillos de 100 pM, donde los grupos de células pueden observarse solo en células C4-2 en presencia del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P. La mezcla no conjugada de anti-CD3 y P-Phthal no tuvo efecto sobre la agrupación celular.

FIG. 12 representa estudios de eficacia *in vivo* del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P. En

el modelo profiláctico, 1×10^6 células C4-2 se mezclaron con 2×10^6 PBMCs (relación 1:2) en Matrigel y se inyectaron SC en el hombro derecho de ratones NOD-SCID macho. El conjugado de anticuerpos del agente de focalización P, Fab no conjugado o PBS ($n = 6$) se administraron a 2 mg/kg todos los días durante 10 días por vía intravenosa a partir del día 4. Los tumores se monitorizaron mediante mediciones de calibre externo durante intervalos regulares durante 6 semanas. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización P suprimió el crecimiento tumoral ($p < 0,0001$) mientras que los grupos de control desarrollaron tumores rápidos. * indica que los ratones con tumores grandes ($> 1000 \text{ mm}^3$) fueron sacrificados antes de estos días.

FIG. 13 representa el diseño del compuesto de orientación de PSMA de segunda generación, P-TriA. El grupo amida en la posición C-9 en P-Phthal se cambió a un grupo triazol para aumentar la afinidad con una bolsa hidrófoba cerca del sitio activo de la enzima PSMA. En base a la distancia entre el primer y el segundo bolsillo de unión hidrófoba ($\sim 11 \text{ \AA}$) en la estructura cristalina, se introdujo un conector de hidrocarburo más corto antes del grupo ftalimida.

FIG. 14 representa las estructuras químicas de P-Tet, P-Und y P-DNP.

FIG. 15A-J representan esquemas de reacción para la síntesis de (S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(aminooxi))-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecano-14-ilcarbamoilo)benzamido)hexilo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-carboxipentilo)ureido)ácido pentanodioico (P-TriA).

FIG. 15K representa el análisis ESI-MS P-TriA conjugado con un Fab anti-CD3.

FIG. 15L representa el espectro de masa desconvolucionado de P-TriA conjugado con un Fab anti-CD3.

FIG. 16A-B representan los resultados de un ensayo de inhibición de PSMA. (A) representa curvas representativas de inhibición de PSMA por diferentes inhibidores. (B) representa una curva Km obtenida del ensayo de inhibición de PSMA.

FIG. 17A-B representan los resultados de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* en células C4-2 a las 24 horas y 48 horas.

FIG. 18 representa estructuras de agentes de focalización ejemplares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0045] Antes de describir los presentes procedimientos y composiciones, es de entenderse que esta invención no se limita al método o composición particular descrita, como tal, puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante. Se exponen ejemplos para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

[0046] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que es también específicamente divulgado cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en donde cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también está incluido dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo declarado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

[0047] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos.

[0048] Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas aquí tienen componentes y características discretas que pueden separarse fácilmente a partir de o en combinación con las características de cualquiera de las otras varias formas de realización sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método recitado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos recitados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

[0049] Hay que señalar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el péptido" incluye referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

[0050] Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

[0051] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden: un agente de focalización que se une a una célula diana, en donde el agente de focalización no es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no se une a la célula diana; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores y en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno en una célula efectora citotóxica. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El agente de focalización puede estar unido específicamente al sitio por uno o más conectores al uno o más aminoácidos no naturales del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0052] También se describen en el presente documento conjugados de anticuerpos de agente de focalización. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender Fórmula I: X-L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde (a) X comprende al menos una porción de anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (b) L1 comprende uno o más enlazadores; y (c) Y comprende un agente de focalización, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio. Generalmente X se une a una célula efectora citotóxica e Y se une a una célula diana. Por ejemplo, X puede unirse a un antígeno en una célula T citotóxica e Y puede unirse a un receptor o marcador de superficie celular en una célula cancerosa. Otro ejemplo es que una célula efectora citotóxica puede ser un macrófago y la célula diana puede ser un patógeno.

[0053] En el presente documento se describen conjugados de anticuerpos del agente de focalización. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender Fórmula I: X-L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde (a) X comprende al menos una porción de anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (b) L¹ comprende uno o más enlazadores; y (c) Y comprende un agente de focalización, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al agente de focalización por uno o más enlazadores y en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización están unidos específicamente al sitio. Generalmente, el conjugado de anticuerpo del agente de focalización comprende uno o más aminoácidos no naturales. Generalmente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende uno o más aminoácidos no naturales.

[0054] También se describen en el presente documento conjugados de anticuerpos de la Fórmula I: X- L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde X comprende más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede comprender 1, 2, 3, 4 o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. X puede comprender dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden estar unidos por un péptido. El péptido puede tener aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud. El péptido puede tener aproximadamente cinco aminoácidos de longitud. X puede comprender uno o más fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs). X puede comprender uno o más Fabs. X puede comprender 1, 2, 3, 4 o más scFv. X puede comprender 1, 2, 3, 4 o más Fabs. X puede comprender un Fab monovalente. X puede comprender un Fab bivalente. X puede comprender un Fab trivalente. X puede comprender un Fab tetravalente. X puede comprender un scFv monovalente. X puede comprender un scFv bivalente. X puede comprender un scFv trivalente. X puede comprender un scFv tetravalente. Uno o más Fabs pueden ser iguales. Uno o más Fabs pueden ser diferentes. Uno o más scFvs pueden ser iguales. Uno o más scFvs pueden ser diferentes.

[0055] También se describe en el presente documento conjugados de anticuerpos de la Fórmula I: X- L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde X comprende más de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo e Y comprende uno o más agentes de focalización. Y puede comprender 1, 2, 3, 4 o más agentes de focalización. El uno o más agentes de focalización pueden ser los mismos. El uno o más agentes de focalización pueden ser diferentes. El conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender un segundo enlazador en donde el primer enlazador une un agente de focalización al primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el segundo enlazador une el segundo agente de focalización al segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El agente de focalización puede comprender 2, 3, 4 o más enlazadores en los que cada enlazador une cada agente de focalización a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del conjugado de anticuerpo de focalización.

[0056] También se describe en este documento conjugados de anticuerpo de focalización de la Fórmula I: XL¹-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y en donde Y comprende uno o más agentes de focalización. Y puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más agentes de focalización. El uno o más agentes de focalización pueden ser los mismos. El uno o más agentes de focalización pueden ser diferentes. El conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más enlazadores en los que cada enlazador une un agente de focalización al anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0057] La eficacia de los conjugados de anticuerpo de focalización puede ser optimizada mediante la modificación de la estructura de enlazador, longitud del enlazador, la orientación de unión relativa y la estequiometría del agente de

focalización. Los enfoques químicos convencionales que usan la química de lisina o cisteína para unir restos de unión a antígeno tienden a producir productos heterogéneos que probablemente difieren en su capacidad para acomodar geometrías productivas para la formación de sinapsis inmunológicas y/o tienen una estabilidad o vida media reducida in vivo. Para eludir estos desafíos, existen conjugados de anticuerpos de antígenos de focalización descritos en este documento que incorporan aminoácidos no naturales, que permiten un control preciso de la colocación de restos de enlazador y por lo tanto control preciso sobre la geometría de conjugado de anticuerpo de agente de focalización así como la generación de reservas homogéneas de conjugados de anticuerpos de agente de focalización.

[0058] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a un antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). El agente de focalización puede ser DUPA. El fragmento de anticuerpo puede ser un Fab anti-CD3. El Fab anti-CD3 puede ser UCHT1. El enlazador puede ser un enlazador P-TriA. El enlazador puede ser un enlazador P-Und. El enlazador puede ser un enlazador P-Tet. El enlazador puede ser un enlazador P-Phthal. El enlazador puede ser un enlazador P-DNP. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además un segundo Fab anti-CD3. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además un segundo, tercer o cuarto agente de focalización que se une a un antígeno de membrana específico de próstata. El segundo, tercer o cuarto agente de focalización que se une a un antígeno de membrana específico de próstata puede comprender DUPA. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un Fab anti-CD3 bivalente y cuarto DUPA, en donde un primer y un segundo DUPA están unidos por un primer enlazador y un segundo enlazador a un primer Fab del Fab anti-CD3 y un tercer y un cuarto DUPA están vinculados por un tercer vinculador y un cuarto vinculador a un segundo Fab del Fab anti-CD3. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en los que el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado al sitio con DUPA. DUPA puede estar específicamente vinculado al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0059] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a una molécula tipo lectina de tipo c. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el agente de focalización que se une a la molécula tipo lectina de tipo c. El agente de focalización que se une a la molécula similar a la lectina de tipo c puede unirse específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0060] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a un receptor de colecistoquinina B (CCKBR). El agente de focalización que se une al receptor de colecistoquinina B puede comprender pentagastrina. El agente de focalización que se une al receptor de colecistoquinina B puede comprender un antagonista de CCKBR. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado a la pentagastrina. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el antagonista de CCKBR. El antagonista de CCKBR puede estar unido específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo. La pentagastrina se puede unir específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo.

[0061] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a un receptor de hormona liberadora de gonadotropina (GnRHR). El agente de focalización que se une al receptor GnRHR puede comprender la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado al sitio con GnRH. La GnRH puede estar unida específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo.

[0062] En este documento se divulga un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a un receptor 2 de somatostatina (SST2). El agente de focalización que se une al receptor de somatostatina 2 puede comprender octreótido. El agente de focalización que se une al receptor de somatostatina 2 puede comprender octreotato. El agente de focalización que se une al receptor 2 de somatostatina puede comprender un análogo de

somatostatina. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en los que el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado a octreótido, octreotato o análogo de somatostatina. El análogo de octreótido, octreotato o somatostatina puede estar unido específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0063] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a una integrina avb3. El agente de focalización que se une a la integrina avb3 puede comprender un péptido cíclico Arginina-Glicina-ácido aspártico (cRGD). El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado al sitio con cRGD. La cRGD puede estar unida específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo.

[0064] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une a un receptor peptídico liberador de gastrina. El agente de focalización que se une al receptor del péptido liberador de gastrina puede comprender una bombesina. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede estar específicamente ligado a la bombesina. La bombesina puede estar unida específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0065] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une al receptor de neuroquinina 1. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el agente de focalización que se une al receptor de neuroquinina 1. El agente de focalización que se une al receptor de neuroquinina 1 puede estar unido específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0066] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une al receptor de melanocortina 1. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el agente de focalización que se une al receptor de melanocortina 1. El agente de focalización que se une al receptor de melanocortina 1 puede estar unido específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0067] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une al receptor de neurotensina. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el agente de focalización que se une al receptor de neurotensina. El agente de focalización que se une al receptor de neurotensina se puede unir específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0068] En el presente documento se describe un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo; uno o más enlazadores; y un agente de focalización que se une al receptor Y del neuropéptido. El anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde el aminoácido no natural se incorpora específicamente en el sitio. El anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo puede estar unido específicamente al sitio con el agente de focalización que se une al receptor neuropéptido Y. El agente de focalización que se une al receptor neuropéptido Y se puede unir específicamente al sitio con el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo en el aminoácido no natural del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de anticuerpo.

[0069] En relación con los anticuerpos biespecíficos con dianas de unión similares, los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en el presente documento pueden mostrar una vida media, selectividad y potencia del suero mejoradas.

5 **[0070]** Además se divulgan en el presente documento procedimientos de producción de conjugados de anticuerpos dirigidos de agentes. Estos métodos permiten la generación fácil de diversos conjugados de anticuerpos de agente de focalización con diferentes geometrías relativas.

I. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y agentes de focalización

10 **[0071]** El conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede comprender un constructo de agente de focalización a Ig, en donde X comprende una inmunoglobulina e Y comprende un agente de focalización. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un constructo de agente de focalización Fab, en donde X comprende un fragmento Fab e Y comprende un agente de focalización. X e Y pueden estar unidos por uno o más enlazadores (p. ej., L¹, L²). Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos en el presente documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa y anticuerpos que han sido diseñados. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, ligeras cadenas, moléculas de andamiaje alternativas sin anticuerpos y anticuerpos biespecíficos. A menos que se indique específicamente lo contrario, las declaraciones y afirmaciones que usan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" pueden incluir específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".

25 **[0072]** Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos humanos, totalmente humanos, humanizados, humanos modificados, no humanos, y/o quiméricos. Por ejemplo, el anticuerpo de Fórmula I puede ser un anticuerpo humanizado. En otro ejemplo, el anticuerpo de Fórmula I es un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos descritos en este documento pueden basarse o derivarse de anticuerpos humanos, completamente humanos, humanizados, diseñados por humanos, no humanos y/o quiméricos. Por ejemplo, X de Fórmula IA puede basarse o derivarse de un anticuerpo de ingeniería humana. Alternativamente, X de la Fórmula IA puede estar basado en o derivarse de un anticuerpo no humano. El anticuerpo no humano puede humanizarse para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras se conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las CDR (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprende al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

40 **[0073]** Los anticuerpos humanizados y los métodos para fabricarlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 86: 10029-10033 (1989); Pat. N^{os} 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005) (que describe el injerto SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol* 28: 489-498 (1991) (que describe "revestimiento"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36: 43-60 (2005) (que describe "barajado de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36: 61-68 (2005); Klimka y col., *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para barajar FR); y Studnicka et al., Patente de Estados Unidos N^o 5.766.886.

50 **[0074]** Los anticuerpos quiméricos pueden referirse a anticuerpos creados mediante la unión de dos o más genes de anticuerpos que originalmente codifican para los anticuerpos separados. Un anticuerpo quimérico puede comprender al menos un aminoácido de un primer anticuerpo y al menos un aminoácido de un segundo anticuerpo, en donde el primer y el segundo anticuerpo son diferentes. X (p. ej., el anticuerpo de Fórmula I, IA, II) puede ser un anticuerpo quimérico. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de una especie bovina, una especie humana o una especie murina. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de una vaca. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de una rata, una cabra, un conejillo de indias o un conejo. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de un humano. Al menos una porción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser de mono cynomolgus.

60 **[0075]** Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden estar basados en o derivarse de un anticuerpo o fragmento del anticuerpo de un mamífero, ave, pescado, anfibio, reptil. Los mamíferos incluyen, entre otros, carnívoros, roedores, elefantes, marsupiales, conejos, murciélagos, primates, focas, osos hormigueros, cetáceos, ungulados de dedos impares y ungulados de dedos pares. El mamífero puede ser un humano, un primate no humano, un ratón, una oveja, un gato, un perro, una vaca, un caballo, una cabra o un cerdo.

65 **[0076]** Las aves incluyen, entre otras, albatros, colibríes, águilas, avestruces, cardenales, kiwis y pingüinos. Los peces pueden ser peces cartilaginosos, peces con aletas radiadas o peces con aletas lobuladas. Los anfibios pueden incluir,

entre otros, tritones, salamandras, ranas y sapos. Los ejemplos de reptiles incluyen, entre otros, tortugas, escuamatos, cocodrilos y tuataras. Los escuamatos pueden incluir amphisbaenas, lagartos y serpientes.

5 **[0077]** Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser reactivas entre especies. Por ejemplo, un anticuerpo puede reconocer un antígeno humano y un antígeno de mono cynomolgus (p. ej., anticuerpo humano/cyno).

10 **[0078]** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender al menos una porción de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 70% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 90% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que es al menos 97% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2.

25 **[0079]** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende cinco o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Los aminoácidos pueden ser no consecutivos.

35 **IA. Anticuerpo o fragmentos de anticuerpos de X.**

[0080] Los anticuerpos descritos en el presente documento puede comprender X, en donde X comprende al menos una porción de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. X puede comprender un anticuerpo completo. X puede comprender al menos una porción de anticuerpo. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo monoclonal. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo policlonal. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo multivalente.

45 **[0081]** X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo. La porción del anticuerpo puede comprender un fragmento de anticuerpo. La porción del anticuerpo puede ser una inmunoglobulina (Ig). La inmunoglobulina puede seleccionarse de una IgG, una IgA, una IgD, una IgE, una IgM, un fragmento de la misma o una modificación de la misma. La inmunoglobulina puede ser IgG. La IgG puede ser IgG1. La IgG puede ser IgG2. La IgG puede tener mutaciones de Fc para reducir la unión de FcR. Las mutaciones de Fc en la IgG1 pueden ser L234A y L235A. Las mutaciones de Fc en la IgG1 pueden ser L234A y L235E. La mutación Fc en el IgG1 puede ser N297A. La mutación Fc en la IgG2 puede ser V234A y V237A. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras, moléculas de andamio alternativas sin anticuerpos y anticuerpos biespecíficos. X puede comprender un fragmento Fab. X puede comprender al menos una porción de una cadena pesada (HC) de un anticuerpo. X puede comprender al menos una porción de una cadena ligera (LC) de un anticuerpo. X puede comprender al menos una porción de una región variable de un anticuerpo. X puede comprender al menos una porción de una región constante de un anticuerpo.

60 **[0082]** X puede comprender al menos una porción de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos un 60% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos un 70% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 90% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que sea al menos 95% idéntica a una secuencia

seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que es al menos 97% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2.

5 [0083] X puede comprender una secuencia que comprende cinco o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que comprende 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos basados o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que comprende 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que comprende 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 1-2. X puede comprender una secuencia que comprende 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos basados o derivados de una secuencia seleccionada de SEC ID N^o: 1-2. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Los aminoácidos pueden ser no consecutivos.

15 [0084] X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un receptor en una célula. X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un correceptor en una célula. X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un antígeno o marcador de superficie celular en una célula. La célula puede ser una célula hematopoyética. La célula hematopoyética puede ser una célula mielóide. La célula mielóide puede ser un eritrocito, trombocito, monocito, eosinófilo, basófilo o mastocito. La célula hematopoyética puede ser una célula linfóide. La célula hematopoyética puede ser un macrófago. La célula hematopoyética puede ser un neutrófilo. La célula linfóide puede ser una célula B, una célula T o una célula NK. La célula hematopoyética puede ser un leucocito. La célula hematopoyética puede ser un linfocito. La célula T puede ser una célula T citotóxica, una célula T auxiliar, una célula T reguladora, una célula T de memoria o una célula T asesina natural. La célula T puede ser una célula T citotóxica. La célula T puede ser una célula T asesina. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo anti-receptor de células T. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo co-receptor de células T anti. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula T. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo que se une a una proteína de la superficie celular en una célula T. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo que se une a un marcador de superficie celular en una célula T. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo que se une a un grupo de proteínas de diferenciación en una célula T. X puede comprender al menos una porción de un anticuerpo anti-CD3. X puede comprender un anticuerpo anti-CD3. El anticuerpo anti-CD3 puede ser UCHT1. X puede comprender al menos una porción de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3. X puede comprender un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti-CD3. X puede comprender un Fab antiCD3 reactivo cruzado humano/cynonolus (p. ej., SP34).

35 [0085] X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un receptor en una célula. X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un correceptor en una célula. X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un antígeno o marcador de superficie celular en una célula. La célula puede ser una célula inmune. La célula puede ser una célula hematopoyética. La célula hematopoyética puede ser una célula mielóide. La célula mielóide puede ser un eritrocito, trombocito, neutrófilo, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo o mastocito. La célula hematopoyética puede ser una célula linfóide. La célula linfóide puede ser una célula B, una célula T o una célula NK. La célula hematopoyética puede ser un leucocito. La célula hematopoyética puede ser un linfocito. La célula puede ser una célula genéticamente modificada. La célula puede modificarse genéticamente para tener actividad citotóxica. La célula puede modificarse genéticamente para tener una actividad citotóxica mejorada. La célula puede modificarse para tener una actividad citotóxica disminuida.

50 [0086] X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un receptor en una célula T. El receptor puede ser un receptor de células T (TCR). El TCR puede comprender TCR alfa, TCR beta, TCR gamma y/o TCR delta. El receptor puede ser un receptor de células T zeta.

[0087] X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a al menos una porción de un receptor en un linfocito, célula B, macrófago, monocitos, neutrófilos y/o células NK. El receptor puede ser un receptor Fc. El receptor Fc puede ser un receptor Fc-gamma, un receptor Fc-alfa y/o un receptor Fc-epsilon. Los receptores Fc-gamma incluyen, entre otros, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a) y FcγRIIIB (CD16b). Los receptores Fc-alfa incluyen, pero no se limitan a, FcαRI. Los receptores de Fc-epsilon incluyen, pero no se limitan a, FcεRI y FcεRII. El receptor puede ser CD89 (fragmento Fc del receptor de IgA o FCAR). El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede unirse específicamente a bacterias u hongos patógenos cuando el conjugado de anticuerpo del agente de focalización comprende un anticuerpo de unión al receptor Fc.

60 [0088] X puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al menos a una porción de un correceptor en una célula T. El correceptor puede ser un CD3, CD4 y/o CD8. X puede comprender un fragmento de anticuerpo que se une a un correceptor CD3. El correceptor CD3 puede comprender CD3-gamma, CD3-delta y/o CD3-epsilon. CD8 puede comprender cadenas CD8-alfa y/o CD8-beta.

65 [0089] X puede comprender un anticuerpo o al menos una porción de un anticuerpo que es un anticuerpo humano, completamente humano, humanizado, diseñado por humanos, no humano o quimérico. X puede comprender un

anticuerpo o al menos una porción de un anticuerpo que es un anticuerpo de mamífero. X puede comprender un anticuerpo o al menos una porción de un anticuerpo que es un anticuerpo no mamífero.

5 [0090] X puede comprender una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o secuencias de fragmentos de anticuerpos. X puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. X puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 70% homóloga a una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. X puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 80% homóloga a una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. X puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 90% homóloga a una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. X puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 95% homóloga a una secuencia basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos. La secuencia puede ser una secuencia peptídica. Alternativamente, la secuencia es una secuencia de nucleótidos.

15 [0091] X puede comprender una secuencia de péptidos que difiere de una secuencia de péptidos basados en o derivados de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos por menos de o igual a aproximadamente 20, 17, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4 o menos aminoácidos. X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 4 o menos aminoácidos. X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 3 o menos aminoácidos. X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 2 o menos aminoácidos. X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 1 o menos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser consecutivos, no consecutivos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 3 aminoácidos consecutivos. Alternativamente, o adicionalmente, X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 2 aminoácidos no consecutivos. En otro ejemplo, X puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 5 aminoácidos, en donde 2 de los aminoácidos son consecutivos y 2 de los aminoácidos no son consecutivos.

35 [0092] X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 15 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 12 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 9 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 6 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 4 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 3 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basados en o derivados de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos por menos de o igual a aproximadamente 2 o menos nucleótidos o pares de bases. X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de o igual a aproximadamente 1 o menos nucleótidos o pares de bases. Los nucleótidos o pares de bases pueden ser consecutivos, no consecutivos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 3 nucleótidos consecutivos o pares de bases. Alternativamente, o adicionalmente, X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada en o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 2 nucleótidos o pares de bases no consecutivos. En otro ejemplo, X puede comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en menos de aproximadamente 5 nucleótidos o pares de bases, en donde 2 de los nucleótidos o pares de bases son consecutivos y 2 de los nucleótidos o pares de bases no son consecutivos.

[0093] La secuencia del péptido de X puede diferir de la secuencia de péptidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se basa en y/o se deriva de una o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de dos o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de tres o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de cuatro o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de cinco o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de seis o más sustituciones de aminoácidos. La secuencia peptídica de X puede diferir de la secuencia peptídica del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 20, 25 o más sustituciones de aminoácidos.

[0094] La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se basa en y/o se deriva de uno o más nucleótidos y/o sustituciones de pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de dos o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de tres o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de cuatro o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de cinco o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de seis o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de nueve o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de doce o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de quince o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de dieciocho o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases. La secuencia de nucleótidos de X puede diferir de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde se basa y/o deriva de 20, 22, 24, 25, 27, 30 o más sustituciones de nucleótidos y/o pares de bases.

[0095] X puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. X puede comprender dos o más aminoácidos no naturales. X puede comprender tres o más aminoácidos no naturales. X puede comprender cuatro o más aminoácidos no naturales. X puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales. X puede comprender uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, en donde uno o más de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden uno o más aminoácidos no naturales. X puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, en donde un aminoácido reemplaza a la Lisina 138 de una cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede comprender uno o más aminoácidos no naturales distales al sitio de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede comprender uno o más aminoácidos no naturales cerca del sitio de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. X puede comprender uno o más aminoácidos no naturales en el sitio de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0096] X puede estar acoplado a uno o más enlazadores. X puede estar vinculado a Y por uno o más enlazadores. X puede estar vinculado a Y por dos o más enlazadores. X puede estar vinculado a Y por tres o más enlazadores.

IB. Agentes de focalización de Y

[0097] Y puede comprender un agente de focalización. Y puede no ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Y puede seleccionarse de una molécula pequeña, una molécula de focalización a células, un ligando, una proteína, un péptido, un peptoide, un aptámero de ADN, un ácido nucleico peptídico (PNA), una vitamina, un sustrato o un análogo de sustrato. El péptido puede comprender un péptido cíclico o un péptido lineal. Y puede comprender un ligando. Y puede comprender al menos una porción de un ligando. El ligando puede ser un ligando químico. El ligando puede ser un ligando hormonal. El ligando puede ser un ligando peptídico. El ligando puede ser un ligando proteico. Y puede modificarse químicamente. Y puede derivatizarse (p. ej., con una proteína o péptido natural). Y puede ser una molécula pequeña. Y puede ser lo suficientemente pequeño como para penetrar en un tejido. Y puede ser lo suficientemente pequeño como para penetrar un tumor. Y puede comprender una molécula pequeña, produciendo así un conjugado de anticuerpo de molécula pequeña (SMAC) cuando se conjuga con X. La SMAC puede ser lo suficientemente pequeña como para penetrar en un tejido. El SMAC puede ser lo suficientemente pequeño como para penetrar un tumor. La molécula pequeña puede ser susceptible de una amplia modificación química. La molécula pequeña puede derivatizarse fácilmente con otras moléculas, incluidas las proteínas.

[0098] El agente de focalización puede unirse a una célula diana. El agente de focalización puede unirse a una proteína

de superficie celular o un marcador de superficie celular en una célula. El agente de focalización puede unirse a una proteína, un péptido o una biomolécula, en donde la proteína, el péptido o la biomolécula no está unida a una célula. La proteína, péptido o biomolécula puede estar circulando en el torrente sanguíneo. La proteína, el péptido o la biomolécula pueden ser un componente de la matriz extracelular. La proteína puede ser una enzima. La enzima puede tener actividad enzimática. Una biomolécula, por ejemplo no limitante, puede seleccionarse de una fibra, un biopolímero (p. ej., colágeno), un glicano, un proteoglicano, un lípido, un esteroide, un carbohidrato, un ácido nucleico y un fragmento celular.

[0099] El agente de focalización del conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede tener un efecto terapéutico, ya que aporta una célula efectora citotóxica en la proximidad de una célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista de la construcción del anticuerpo del agente de focalización puede deberse a que el conjugado de anticuerpo del agente de focalización recluta una célula efectora citotóxica a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista de la construcción del anticuerpo del agente de focalización puede deberse totalmente al conjugado de anticuerpo del agente de focalización que recluta una célula efectora citotóxica a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista del constructo de anticuerpo del agente de focalización puede deberse principalmente al conjugado de anticuerpo del agente de focalización que recluta una célula efectora citotóxica a la célula diana.

[0100] El efecto terapéutico de la indicación prevista puede deberse al conjugado de anticuerpo del agente de focalización que recluta una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. El efecto terapéutico de la indicación prevista puede deberse totalmente al conjugado de anticuerpos del agente de focalización que recluta una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. El efecto terapéutico sobre la indicación prevista puede deberse al menos parcialmente al conjugado de anticuerpos del agente de focalización que recluta una proteína, péptido o biomolécula a la célula diana.

[0101] El agente de focalización solo puede no tener ningún efecto terapéutico. El agente de focalización solo puede no tener ningún efecto terapéutico hacia una indicación prevista del conjugado de anticuerpo del agente de focalización. El agente de focalización puede no tener un efecto terapéutico hacia la indicación prevista del conjugado de anticuerpo del agente de focalización sin conjugarse con el anticuerpo anti-CD3 o el fragmento de anticuerpo. La dosis del agente terapéutico cuando se administra como parte del conjugado de anticuerpos del agente de focalización para proporcionar un efecto terapéutico puede no tener un efecto terapéutico cuando el agente terapéutico se administra solo a esa dosis. El agente de focalización del conjugado de anticuerpo del agente de focalización no puede tener ningún efecto terapéutico además de reclutar la célula efectora citotóxica a la célula diana. El agente de focalización del conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede tener un efecto terapéutico en la célula diana, en donde el efecto terapéutico es insignificante en relación con el efecto terapéutico de reclutar la célula efectora citotóxica, proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. El agente de focalización del conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede tener un efecto terapéutico en la célula diana, en donde el efecto terapéutico es menor que el efecto terapéutico de reclutar la célula efectora citotóxica, proteína, péptido o biomolécula a la célula diana. La unión del agente de focalización a la célula diana puede inducir una respuesta no intencional de la célula diana. La unión del agente de focalización a la célula diana puede inducir un efecto terapéutico involuntario además del efecto terapéutico de reclutar la célula efectora citotóxica, proteína, péptido o biomolécula a la célula diana.

[0102] El agente de focalización puede poseer una masa entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 60 kDa. El agente de focalización puede poseer una masa entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 55 kDa. El agente de focalización puede poseer una masa entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa. El agente de focalización puede poseer una masa entre aproximadamente 0,3 kDa y aproximadamente 50 kDa. El agente de focalización puede tener una masa de aproximadamente 0,1 kDa, aproximadamente 0,2 kDa, aproximadamente 0,3 kDa, aproximadamente 0,4 kDa, aproximadamente 0,5 kDa, aproximadamente 0,6 kDa, aproximadamente 0,7 kDa, aproximadamente 0,8 kDa, aproximadamente 0,9 kDa o aproximadamente 1 kDa. El agente de focalización puede comprender una masa de aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 35 kDa, aproximadamente 40 kDa, aproximadamente 45 kDa, aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 55 kDa.

[0103] El agente de focalización de molécula pequeña puede comprender un inhibidor de antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). El PSMA también se conoce como glutamato carboxipeptidasa II y N-acetilo-L-aspartilo-L-glutamato peptidasa I. El inhibidor de PSMA puede ser 2-[3-(1,3-dicarboxipropilo)ureidol]ácido pentanodioico (DUPA) o un derivado del mismo. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un Fab anti-CD3 y dos DUPA, en donde un primero de los dos DUPA está unido por un primer enlazador al Fab anti-CD3 y un segundo de los dos DUPA está unido por un segundo enlazador al Fab anti-CD3.

[0104] Y puede comprender un ligando que se une a al menos una porción de un receptor en una célula. Y puede comprender un ligando que se une a al menos una porción de un co-receptor en una célula. Y puede comprender un ligando que se une a al menos una porción de un antígeno o marcador de superficie celular en una célula. La célula puede ser una célula hematopoyética. La célula hematopoyética puede ser una célula mieloide. La célula mieloide puede ser un eritrocito, trombocito, neutrófilo, monocito, macrófago, eosinófilo, basófilo o mastocito. La célula hematopoyética puede ser una célula linfoide. La célula linfoide puede ser una célula B, una célula T o una célula NK.

La célula hematopoyética puede ser un leucocito. La célula hematopoyética puede ser un linfocito. La célula puede ser una célula de próstata. La célula puede ser una célula de seno. La célula puede ser una célula hepática, renal, pulmonar, cardíaca, muscular, nerviosa, neuronal, cerebral, epitelial, esofágica. La célula puede ser una célula tumoral. La célula puede ser una célula no tumoral. La célula puede ser una célula inflamatoria. La célula inflamatoria puede ser un macrófago. El macrófago puede ser proinflamatorio. El macrófago puede ser antiinflamatorio. La célula puede producir una citocina. La célula puede producir una quimiocina.

[0105] La célula puede ser una célula cancerosa. La célula cancerosa puede derivarse de una glándula de próstata, un seno, un ovario, un cuello uterino, un pulmón, un riñón, un colon, un recto, un cerebro, una glándula tiroides, un páncreas, un tracto gastrointestinal o un estómago. La célula cancerosa puede derivarse de un tejido epitelial, un tejido estromal o un tejido endometrial.

[0106] Y puede comprender un ligando que se une a un receptor en una célula. El receptor puede ser un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un receptor de tirosina quinasa, un receptor de citocina o una integrina. El receptor puede ser un receptor del factor de crecimiento. El receptor del factor de crecimiento puede ser un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). El EGFR puede ser EGFR1. El EGFR puede ser Her2. El receptor puede ser un receptor de colecistoquinina B. El receptor puede ser un receptor de hormona liberadora de gonadotropina. El receptor puede ser un receptor de somatostatina. El receptor puede ser el receptor 2 de somatostatina. El receptor puede ser un receptor peptídico liberador de gastrina. El receptor puede ser un receptor de neuroquinina. Puede ser el receptor de neuroquinina 1, también conocido como receptor de taquiquinina 1. El receptor puede ser un receptor de melanocortina. El receptor puede ser el receptor de melanocortina 1. El receptor puede ser un receptor de neurotensina. El receptor puede ser un receptor neuropéptido Y. El receptor neuropéptido Y (NPYR) puede seleccionarse entre NPY1R, NPY2R, PYPY1 y NPY5R.

[0107] Y puede unirse a un antígeno o marcador de superficie celular en una célula. El antígeno o marcador de la superficie celular puede comprender un grupo de proteínas de diferenciación. La proteína de diferenciación puede comprender CD38.

[0108] Y puede unirse a una molécula de adhesión. La molécula de adhesión puede ser CLL-1.

[0109] Y puede unirse a una integrina. La integrina puede ser una integrina av. La integrina puede ser la integrina avB3.

[0110] Y puede unirse a un antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). Y puede comprender DUPA. Y puede consistir esencialmente en DUPA.

[0111] Y puede ser un agonista del receptor acoplado a proteína G. Y puede ser un antagonista del receptor acoplado a la proteína G. Y puede ser un agonista del receptor de colecistoquinina (CCK). Y puede ser un antagonista del receptor de colecistoquinina (CCK). Y puede ser un agonista del receptor de colecistoquinina A. Y puede ser un antagonista del receptor de colecistoquinina A. Y puede ser un agonista del receptor de colecistoquinina B. Y puede ser un antagonista del receptor de colecistoquinina B. El antagonista del receptor de colecistoquinina B puede ser pentagastrina.

[0112] Y puede comprender una hormona. Y puede comprender un ligando hormonal. Y puede comprender un agonista del receptor hormonal. Y puede comprender un antagonista del receptor hormonal. Y puede comprender la hormona liberadora de gonadotropina. Y puede ser un ligando del receptor de melanocortina. Y puede comprender hormona estimulante de melanocitos α , afamelanotide, BMS-470539, bremelanótido, péptido de señalización Melanotan II o agouti.

[0113] Y comprende un neuropéptido. Y puede comprender una taquiquinina. Y puede comprender un ligando del receptor de neuroquinina. Y puede comprender la sustancia P. Y puede formar una neuroquinina. La neuroquinina puede ser neuroquinina A. El neuropéptido puede comprender el neuropéptido Y. Y puede comprender un agonista del receptor neuropéptido Y o un antagonista del receptor neuropéptido Y. El agonista del receptor neuropéptido Y puede seleccionarse del péptido YY y el polipéptido pancreático. El antagonista del receptor neuropéptido Y puede seleccionarse de BIBP-3226, Lu AA-33810, BIIIE-0246 y UR-AK49. El neuropéptido puede comprender un ligando del receptor de neurotensina. El ligando del receptor de neurotensina puede ser un agonista del receptor de neurotensina. El agonista del receptor de neurotensina puede seleccionarse de beta-lactotensina, JMV-449, neurotensina, neuromedina N, PD-149,163 y agonistas parciales no peptídicos derivados de SR-48692. El ligando del receptor de neurotensina puede comprender un antagonista del receptor de neurotensina. El antagonista del receptor de neurotensina puede seleccionarse de Levocabastina (selectivo de NTS₂, también antagonista de histamina H₁), SR-48692 (NTS₁ selectivo) o SR-142.948.

[0114] Y puede comprender una hormona peptídica. La hormona peptídica puede ser una somatostatina, una hormona inhibidora de la hormona del crecimiento o un factor inhibidor de la liberación de somatotropina o una hormona inhibidora de la liberación de somatotropina. Y puede comprender un análogo de somatostatina. Y puede comprender

octreotrida. Y puede comprender octreotato. El octreotato puede estar marcado por DOTA para imágenes de PET ⁶⁸Ga y radioterapia ¹⁷⁷Lu.

[0115] Y puede comprender un péptido. Y puede comprender un péptido pequeño. Y puede comprender un ligando peptídico pequeño. Y puede comprender un péptido cíclico. Y puede comprender una secuencia de Arginina-Glicina-Ácido Aspartático (RGD). Y puede comprender un ligando que contiene RGD para una integrina. Y puede comprender cRGD. Y puede comprender cilengtida. El péptido pequeño puede comprender un ligando para un receptor de péptido liberador de gastrina. El péptido pequeño puede comprender un ligando para un receptor de bombesina seleccionado de BBR1, BBR2 y BBR3. El ligando para un receptor peptídico liberador de gastrina puede comprender bombesina, neuromedina B, péptido liberador de gastrina. El ligando para el receptor peptídico liberador de gastrina puede comprender bombesina.

[0116] El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un isótopo radiomarcado. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un agente quelante para un isótopo radiomarcado. El agente de focalización puede comprender un isótopo radiomarcado. El agente de focalización puede comprender un agente quelante para un isótopo radiomarcado. Y puede comprender un agente quelante para un isótopo radiomarcado. Y puede comprender un (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-ácido 1,4,7,10-tetraacético) DOTA. El isótopo radiomarcado puede comprender itrio. El isótopo radiomarcado puede ser ⁹⁰Y. DOTA puede comprender DOTATOC. DOTA puede comprender DOTA-TATE.

[0117] Y puede comprender al menos una porción de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos un 60% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos un 70% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos 50% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que es al menos 90% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que sea al menos 95% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que es al menos 97% idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40.

[0118] Y puede comprender una secuencia que comprende cinco o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que comprende 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos basados o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que comprende 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que comprende 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Y puede comprender una secuencia que comprende 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos basados o derivados de una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 3-40. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Los aminoácidos pueden ser no consecutivos.

[0119] Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 20, 17, 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4 o menos aminoácidos. Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada en o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 4 o menos aminoácidos. Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 3 o menos aminoácidos. Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 2 o menos aminoácidos. Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 1 o menos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser consecutivos, no consecutivos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada en o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de aproximadamente 3 aminoácidos consecutivos. Alternativamente, o adicionalmente, Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada en o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de aproximadamente 2 aminoácidos no consecutivos. En otro ejemplo, Y puede comprender una secuencia peptídica que difiere de una secuencia peptídica basada en o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de aproximadamente 5 aminoácidos, en donde 2 de los aminoácidos son consecutivos y 2 de los aminoácidos no son consecutivos.

[0120] Y puede comprender una proteína o péptido basado en una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o menos nucleótidos o pares de bases. Y puede comprender una proteína o péptido basado en una secuencia de nucleótidos que difiere de una secuencia de nucleótidos basada en o derivada de uno o más agentes de focalización en menos de o igual a aproximadamente 15 o menos nucleótidos o pares de bases. Y puede comprender proteína o péptido basado en una

5 **[0125]** La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 1 angstroms (Å) y aproximadamente 120 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 5 angstroms (Å) y aproximadamente 105 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 100 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 90 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 80 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 70 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede estar entre aproximadamente 15 angstroms (Å) y aproximadamente 45 angstroms (Å). La distancia entre X e Y puede ser igual o mayor que aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30 o más angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o mayor que aproximadamente 10 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o mayor que aproximadamente 15 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o mayor que aproximadamente 20 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o menor que aproximadamente 110, 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30 o menos angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o inferior a aproximadamente 100 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o menor que aproximadamente 80 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o menor que aproximadamente 60 angstroms. La distancia entre X e Y puede ser igual o inferior a aproximadamente 40 angstroms.

II. Enlazadores

20 **[0126]** Los conjugados de anticuerpos de agente de focalización aquí descritos pueden contener uno o más enlazadores (p. ej., L1, L2). Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos aquí pueden comprender dos o más enlazadores. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos aquí pueden comprender tres o más enlazadores. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden comprender 4, 5, 6, 7 o más enlazadores.

25 **[0127]** El enlazador puede comprender un enlace químico. El enlazador puede comprender un grupo funcional. El enlazador puede comprender un aminoácido. El enlazador puede comprender un péptido. El enlazador puede comprender un polímero. El polímero puede ser un polietilenglicol.

30 **[0128]** El uno o más enlazadores pueden comprender uno o más grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar con un grupo funcional reactivo complementario en una pareja de acoplamiento. El enlazador puede ser bifuncional. El enlazador bifuncional puede ser heterobifuncional. El conector puede comprender etilenglicol. El conector puede ser un enlazador bifuncional de etilenglicol.

35 **[0129]** Uno o más enlazadores pueden formarse por reacción de un aminoácido en X con un enlazador ya unido a Y. Uno o más enlazadores pueden formarse por reacción de un aminoácido u otro grupo funcional reactivo en Y con un enlazador ya unidos a X. Uno o más enlazadores pueden formarse por reacción de un enlazador ya unido a X con otro enlazador ya unido a Y. Para formar un enlazador ya unido a X o Y, un enlazador bifuncional, con dos grupos de funcionalidades reactivas ortogonalmente, puede estar acoplado a X o Y, de modo que un grupo funcional reactivo restante esté disponible para el acoplamiento posterior.

45 **[0130]** El enlazador puede ser el producto de una reacción bioortogonal, cuyos ejemplos no limitativos se revisan en Kim et al., Curr Opin Chem Bio 17: 412-419 (2013). El enlazador puede comprender una oxima, un tetrazol, un aducto Diels Alder, un aducto hetero Diels Alder, un producto de reacción de sustitución aromática, un producto de reacción de sustitución nucleofílica, un éster, una amida, un carbamato, un éter, un tioéter o un producto de reacción de Michael. El enlazador puede ser un producto de cicloadición, un producto de reacción de metátesis, un producto de reacción de acoplamiento cruzado mediado por metal, un producto de polimerización radical, un producto de acoplamiento oxidativo, un producto de reacción de transferencia de acilo o un producto de reacción de foto clic. La cicloadición puede ser una cicloadición de Huisgen. La cicloadición puede ser una cicloadición Huisgen sin cobre [3+2]. La cicloadición puede ser una reacción de Diels-Alder. La cicloadición puede ser una reacción hetero Diels-Alder. El enlazador puede ser el producto de una reacción mediada por enzimas. El enlazador puede ser un producto de una reacción mediada por transglutaminasa, cuyos ejemplos no limitantes se describen en Lin et al., J. Am. Chem Soc. 128: 4542-4543 (2006) y WO 2013/093809. El enlazador puede comprender un puente disulfuro que conecta dos residuos de cisteína, como la tecnología ThioBridge™ de PolyTherics. El enlazador puede comprender un puente de maleimida que conecta dos residuos de aminoácidos. El enlazador puede comprender un puente de maleimida que conecta dos residuos de cisteína.

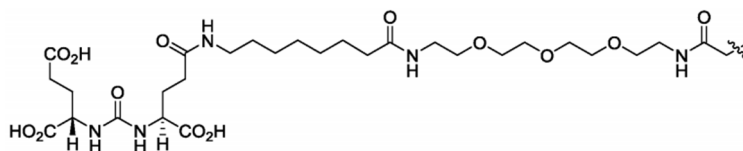
60 **[0131]** Cada uno de los uno o más enlazadores puede comprender uno o más etilenglicoles. Cada uno de los uno o más enlazadores puede comprender al menos un grupo funcional reactivo seleccionado de alcoxi-amina, hidrazina, arilo/alquilo azida, alquino, alqueno, tetrazina, diclorotriazina, tresilato, succinimidilo carbonato, benzotriazol carbonato, nitrofenilo carbonato, triclorofenilo carbonato, carbonilimidazol, succinimidilo succinato, maleimida, vinilsulfona, haloacetamida y disulfuro. El alqueno puede seleccionarse entre norborneno, transcicloocteno y ciclopropeno. Cada uno de los uno o más enlazadores puede comprender al menos una alcoxiamina. Cada uno de los uno o más enlazadores puede comprender al menos una azida. Cada uno de uno o más enlazadores puede comprender al menos un ciclooctino. Cada uno de los uno o más enlazadores puede comprender al menos una tetrazina.

- 5 **[0132]** El enlazador puede acoplarse con uno o más aminoácidos naturales en X o Y. El enlazador puede acoplarse con uno o más aminoácidos no naturales en X o Y. El enlazador puede acoplarse con un aminoácido que es el producto del sitio mutagénesis específica El enlazador puede acoplarse con una cisteína que es el producto de mutagénesis específica del sitio. El enlazador (p. ej., maleimida sustituida) puede acoplarse con una cisteína que es el producto de mutagénesis específica del sitio, así como un residuo de cisteína nativo. Dos enlazadores, cada uno con grupos funcionales reactivos complementarios, pueden unirse entre sí.
- 10 **[0133]** El uno o más enlazadores pueden comprender un enlazador escindible. El uno o más enlazadores pueden comprender un enlazador no escindible. El uno o más enlazadores pueden comprender un enlazador flexible. El uno o más enlazadores pueden comprender un enlazador inflexible.
- 15 **[0134]** El enlazador de etilenglicol puede comprender aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 subunidades de etilenglicol. El uno o más enlazadores pueden incluir un resto 1,4-dicarboxílico. El uno o más enlazadores pueden comprender un resto fenilo sustituido con 1,3-dinitro. El uno o más enlazadores pueden comprender
- 20 **[0135]** El uno o más enlazadores pueden comprender un grupo alcoxi-amina (o aminooxi), grupo azida y/o grupo ciclooctino en uno o más terminales. El uno o más enlazadores pueden comprender una alcoxi-amina en un extremo y un grupo azida en el otro extremo. El uno o más enlazadores pueden comprender una alcoxi-amina en un extremo y un grupo ciclooctino en el otro extremo. La alcoxi-amina puede formar una oxima estable con un grupo cetona en un aminoácido. La alcoxi-amina puede formar una oxima estable con un grupo cetona en un aminoácido no natural. El grupo cetona puede estar en una *p*-acetilo fenilalanina (pAcF).
- 25 **[0136]** El uno o más enlazadores pueden estar acoplados a X, Y, o una combinación de los mismos. El uno o más enlazadores pueden estar acoplados a X y/o Y para formar uno o más intermedios de la Fórmula III: L1-X, Fórmula IIIA: X-L1, Fórmula IV: L1-Y o Fórmula IVA: Y-L1. El uno o más enlazadores pueden estar acoplados a X y/o Y por una oxima. El uno o más enlazadores pueden estar acoplados a X y/o Y por un ciclooctino, ciclopropeno, arilo/alquilo azidas, transcicloocteno, norboreno, tetrazina o una combinación de los mismos. El uno o más enlazadores pueden estar acoplados a X y/o Y mediante un enlace covalente, un enlace no covalente, un enlace iónico o una combinación de los mismos.
- 30 **[0137]** Los dos o más enlazadores pueden estar unidos. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más reacciones libres de cobre. Los dos o más enlazadores pueden estar vinculados a través de una o más cicloadiciones. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más cicloadiciones Huisgen. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más cicloadiciones Huisgen [3+2] libres de cobre. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más reacciones que contienen cobre. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más reacciones de Diels Alder. Los dos o más enlazadores pueden estar unidos a través de una o más reacciones hetero Diels Alder.
- 35 **[0138]** Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización pueden optimizarse ajustando la longitud del enlazador. Los enlazadores pueden ser relativamente cortos. Los enlazadores pueden ser relativamente largos. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud de aproximadamente 1 angstroms (Å) a aproximadamente 120 angstroms (Å). El uno o más enlazadores pueden tener una longitud de aproximadamente 5 angstroms (Å) a aproximadamente 105 angstroms (Å). El uno o más enlazadores pueden tener entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 100 angstroms (Å) de longitud. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud de entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 90 angstroms (Å). El uno o más enlazadores pueden tener entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 80 angstroms (Å) de longitud. El uno o más enlazadores pueden tener entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 70 angstroms (Å) de longitud. El uno o más enlazadores pueden tener entre aproximadamente 15 angstroms (Å) y aproximadamente 45 angstroms (Å) de longitud. El uno o más enlazadores pueden ser iguales o mayores que aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30 o más angstroms de longitud. El uno o más enlazadores pueden ser iguales o mayores que aproximadamente 10 angstroms de longitud. El uno o más enlazadores pueden ser iguales o mayores que aproximadamente 15 angstroms de longitud. El uno o más enlazadores pueden ser iguales o mayores que aproximadamente 20 angstroms de longitud. El uno o más enlazadores pueden ser iguales o menores que aproximadamente 110, 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30 o menos angstroms de longitud. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud igual o inferior a aproximadamente 100 angstroms. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud igual o inferior a aproximadamente 80 angstroms. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud igual o inferior a aproximadamente 60 angstroms. El uno o más enlazadores pueden tener una longitud igual o inferior a aproximadamente 40 angstroms.
- 40 **[0139]** La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 1 angstroms (Å) y aproximadamente 120 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 5 angstroms (Å) y

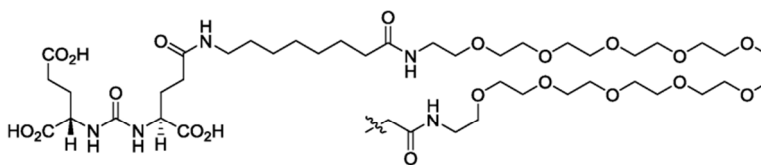
aproximadamente 105 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 100 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 90 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 80 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 10 angstroms (Å) y aproximadamente 70 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede estar entre aproximadamente 15 angstroms (Å) y aproximadamente 45 angstroms (Å). La longitud total de los enlazadores puede ser igual o mayor que aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 30 o más angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o mayor que aproximadamente 10 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o mayor que aproximadamente 15 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o mayor que aproximadamente 20 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o inferior a aproximadamente 110, 100, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30 o menos angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o inferior a aproximadamente 100 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o inferior a aproximadamente 80 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o inferior a aproximadamente 60 angstroms. La longitud total de los enlazadores puede ser igual o inferior a aproximadamente 40 angstroms.

Conjugado de anticuerpo de molécula pequeña de unión a antígeno de membrana específica a próstata (pSMAC)

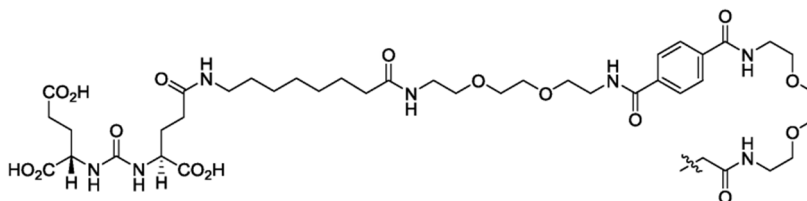
[0140] El conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede comprender un Fab anti-CD3; una o más moléculas DUPA; y uno o más enlazadores, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido al uno o más agentes de focalización por uno o más enlazadores. El Fab anti-CD3 puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. Un primer aminoácido no natural y un segundo aminoácido no natural pueden reemplazar un aminoácido natural del Fab anti-CD3. La primera molécula de DUPA y la segunda molécula de DUPA pueden estar ligadas específicamente a un primer aminoácido no natural y un segundo aminoácido no natural del Fab anti-CD3. El aminoácido natural puede seleccionarse de alanina (Ala), lisina (Lys), serina (Ser) y/o residuo de treonina (Thr) de X y/o Y. El aminoácido natural que se reemplaza puede seleccionarse de Lisina 138 (Lys 138) de una cadena pesada del Fab anti-CD3, alanina 123 (Ala 123) de una cadena pesada del Fab anti-CD3, treonina 109 (Thr 109) de una cadena pesada del Fab anti-CD3 y serina 202 (Ser 202) de una cadena pesada del Fab anti-CD3. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede ser de Fórmula I: X-L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X, en donde: X comprende el Fab antiCD3; L1 comprende el uno o más enlazadores; e Y comprende una o más moléculas DUPA. El agente de focalización conjugado de anticuerpo puede comprender un compuesto seleccionado de los compuestos de Fórmula V, Fórmula VI, Fórmula VII y la Fórmula VIII:



(Formula V),



(Formula VI)

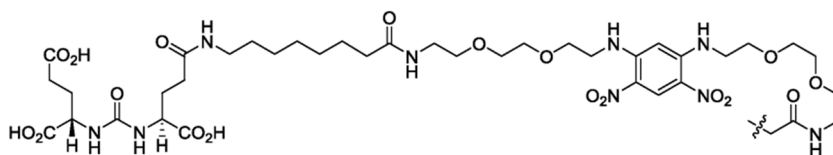


(Formula VII)

Y

65

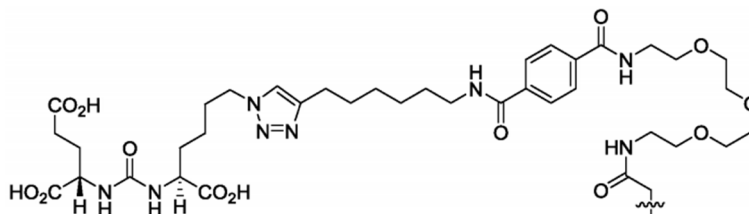
5



(Formula VIII).

10 **[0141]** El conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede comprender un compuesto de Fórmula IX:

15

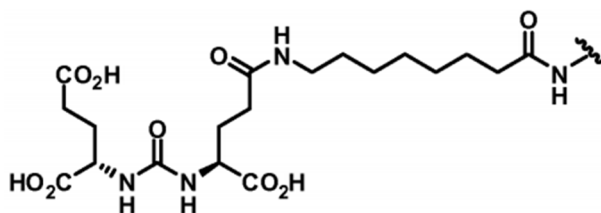


20

(Formula IX).

25 **[0142]** La orientación el conjugado de anticuerpo de agente puede comprender un compuesto de Fórmula X:

30

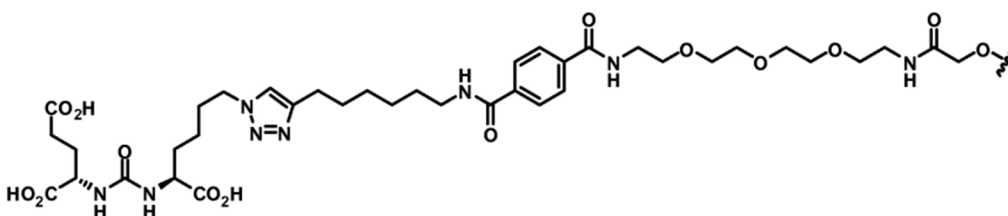


35

(Formula X).

40 **[0143]** El conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede comprender un compuesto de Fórmula XI:

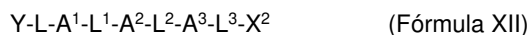
45



50

(Formula XI).

55 **[0144]** En otro aspecto, en este documento se proporcionan compuestos de Fórmula XII:



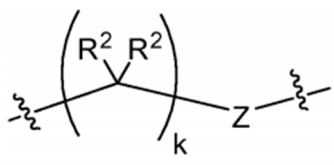
60

en donde:

Y es un ligando de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA);

L es

65



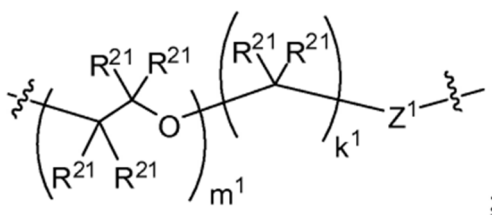
60

A¹ se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un heteroarilo de 5 a 6 miembros, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;

L¹ es

65

5

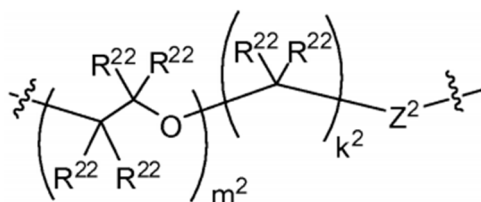


;

10

A² se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-; L² es

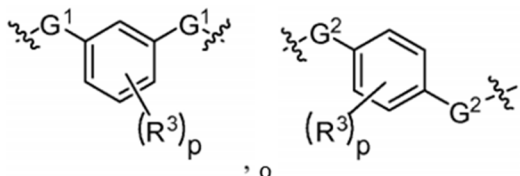
15



20

A³ es un enlace,

25



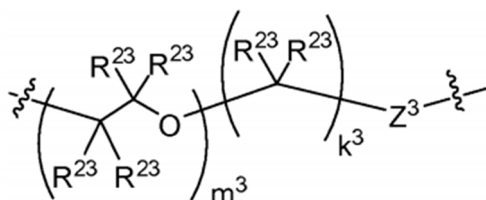
30

, o

;

L³ es

35



40

;

45

X² es un enlazador unido a un grupo funcional que reacciona con un aminoácido, o un enlazador unido a un aminoácido modificado, en donde el aminoácido modificado es parte de X, en donde X es un péptido, proteína o anticuerpo terapéutico modificado;

cada R¹ se selecciona independientemente de H, alquilo, o haloalquilo;

cada R², R²¹, R²² y R²³ se selecciona independientemente de H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo o heteroarilalquilo;

50

cada R³ se selecciona independientemente entre halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo, -NO₂, y NR¹R¹;

cada G¹ y G² se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;

55

cada Z, Z¹, Z² y Z³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -O- y -N(R¹)-;

k, k¹, k² y k³ se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

m¹, m² y m³ se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y

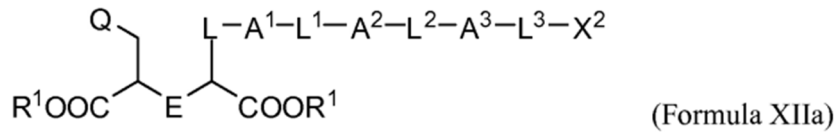
p es 0, 1, 2, 3 o 4;

o un estereoisómero del mismo.

60

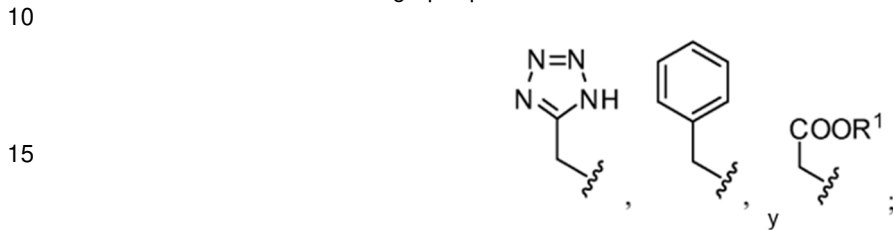
[0145] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIa:

65

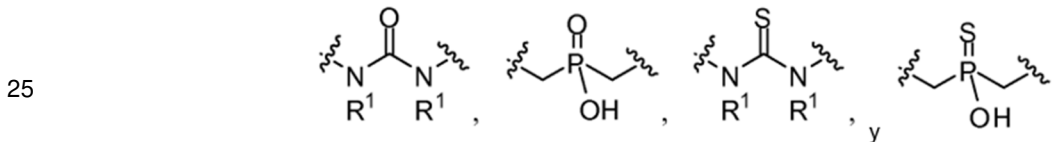


en donde:

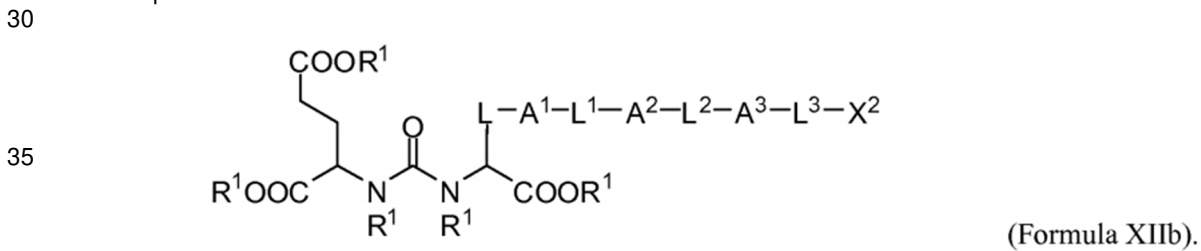
Q se selecciona del grupo que consiste en:



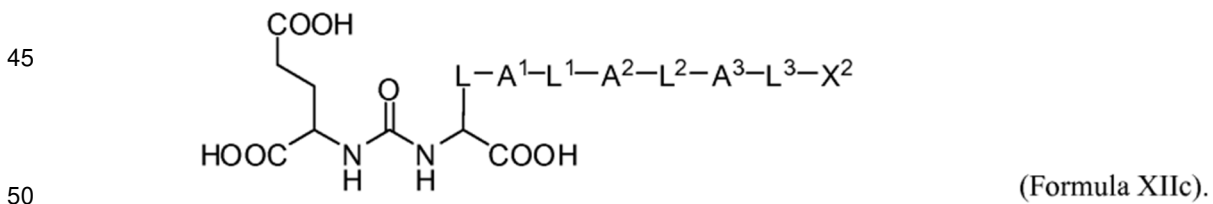
20 y E se selecciona del grupo que consiste en:



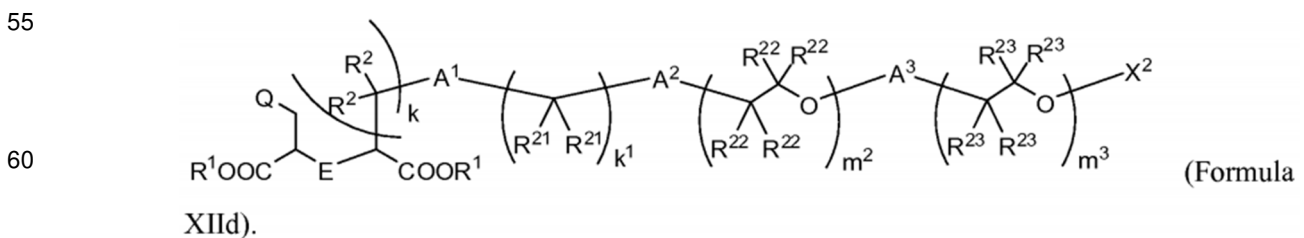
[0146] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIb:



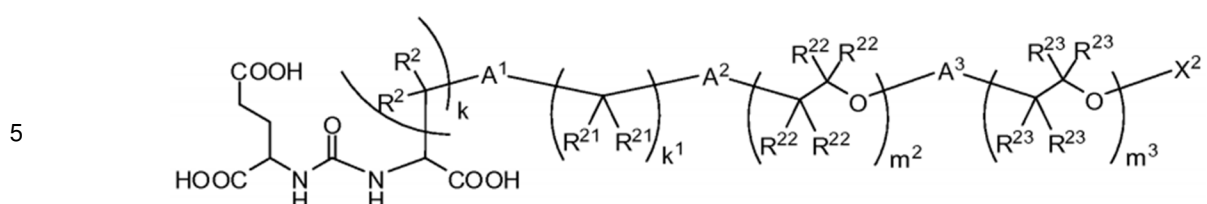
40 En otras realizaciones se ha descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIc:



[0147] En algunas formas de realización descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIIId:

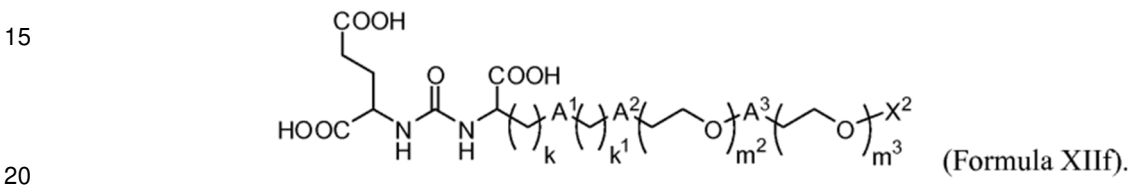


65 En otras realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de Fórmula XIle:

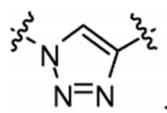


(Formula XIIe).

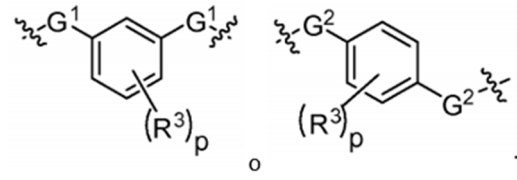
10 En aún más realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto es de la Fórmula XIIIf:



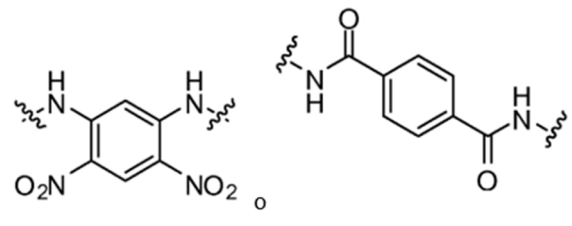
25 [0148] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es -C(O)N(H)-. En algunas formas de realización descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es



35 [0149] En algunas realizaciones se ha descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A³ es

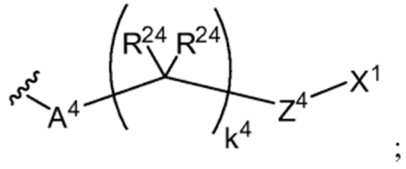


45 En otras formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A³ es



55 [0150] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada R², R²¹, R²², R²³ y R²⁴ se selecciona independientemente de H, F, -CH₃, o -CF₃. En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada R², R²¹, R²², R²³ y R²⁴ es H.

60 [0151] En algunas realizaciones se ha descrito anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es



en donde:

A⁴ se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)-, y -N(R¹)S(O)_{1,2}-; cada R²⁴ se selecciona independientemente entre H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo;
 k⁴ se selecciona entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
 Z⁴ se selecciona de un enlace, arilo y un heteroarilo de 5 a 6 miembros; y
 X¹ es -ONH₂,

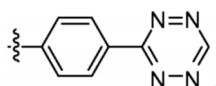
5

10



-N₃,

15

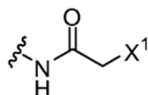


20

-N(H)NH₂, o -SH.

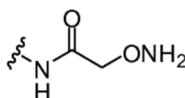
[0152] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es

25



En otras formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es

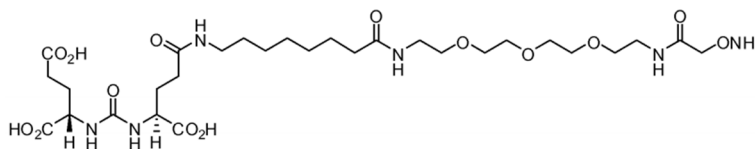
30



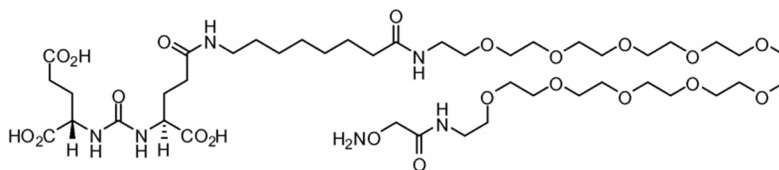
35

[0153] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, el compuesto se selecciona de:

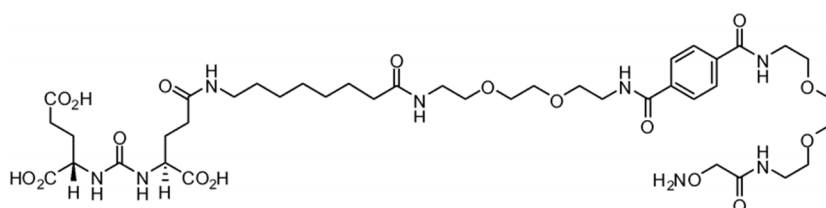
40



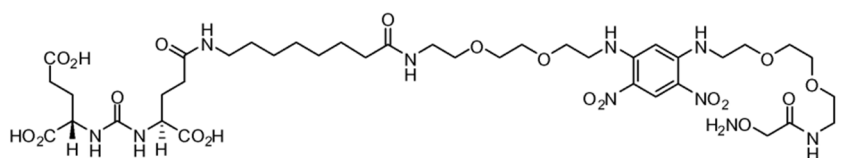
45



50



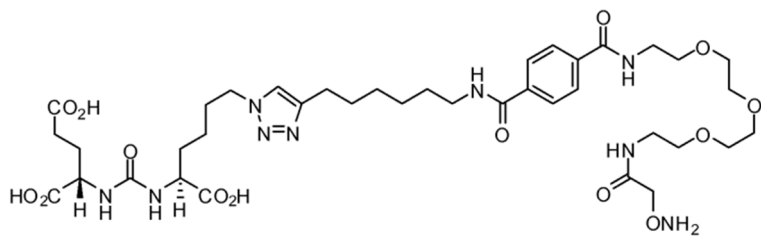
60



65

y

5

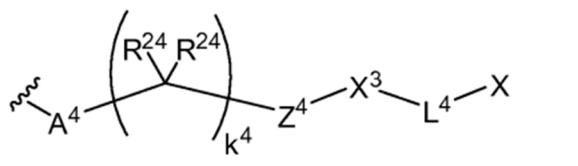


10

o un estereoisómero del mismo.

[0154] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, X² es

15



20

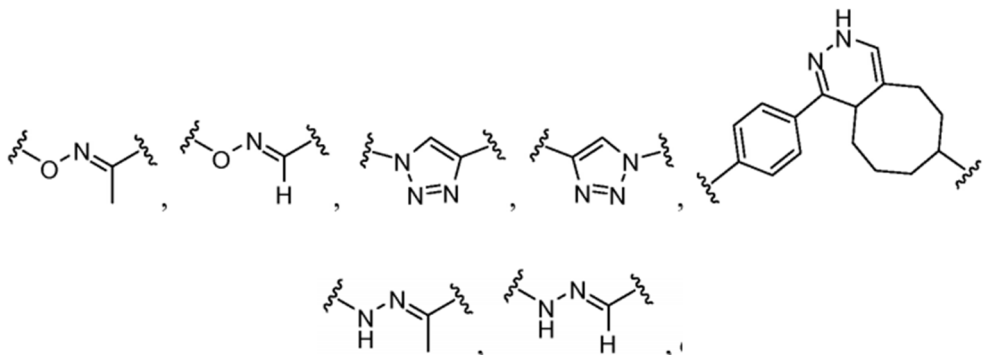
en donde:

25

A⁴ se selecciona del grupo que consiste en un enlace, -C(O)-, -N(R¹)-, -O-, -C(O)N(R¹)-, -N(R¹)C(O)-, -S(O)_{1,2}N(R¹)- y -N(R¹)S(O)_{1,2}-;
 cada R²⁴ se selecciona independientemente entre H, halo, -OR¹, -CN, -SR¹, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilalquilo, o heteroarilalquilo;
 k⁴ se selecciona de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
 Z⁴ se selecciona de un enlace, arilo y un heteroarilo de 5 a 6 miembros; y
 X³ es

30

35



40

45

o -S-;
 X es un péptido, proteína o anticuerpo terapéutico modificado;
 L⁴ es un enlace directamente unido a un aminoácido modificado, o un enlazador unido a un aminoácido modificado, en donde el aminoácido modificado es parte de X.

50

En algunas realizaciones descritas arriba o abajo de un compuesto de Fórmula XII, el aminoácido es un aminoácido no natural.

55

[0155] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, k es 1, 2 o 3; y Z es un enlace.

[0156] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A¹ es -C(O)N(R¹)-, arilo de 6 miembros, o heteroarilo de 5 miembros.

60

[0157] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m¹ es 0; k¹ es 6 o 7; y Z¹ es un enlace.

[0158] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es un enlace; m² y k² son 0; y Z² es un enlace.

65

[0159] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A² es -

C(O)N(H)-; m^2 es 2; k^2 es 2; y Z^2 es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A^2 es -C(O)N(H)-; m^2 es 3; k^2 es 2; y Z^2 es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A^2 es -C(O)N(H)-; m^2 es 10; k^2 es 2; y Z^2 es un enlace.

5 [0160] En algunas formas de realización descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, R^3 es -NO₂; y p es 2.

10 [0161] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, cada GX^1 y GX^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -N(H)-, -C(O)N(H)-, y -N(H)C(O)-.

[0162] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m^3 es 3; k^3 es 2; y Z^3 es un enlace. En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, m^3 es 2; k^3 es 2; y Z^3 es un enlace.

15 [0163] En algunas realizaciones descritas anteriormente o a continuación de un compuesto de Fórmula XII, A^3 es un enlace; m^3 y k^3 son 0; y Z^3 es un enlace.

20 III. Aminoácidos no naturales

[0164] Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos aquí pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. Como se usa en el presente documento, los términos "aminoácido no natural" y "aminoácido no natural" se refieren a aminoácidos no proteínógenos que se producen de forma natural o se sintetizan químicamente. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden comprender X, en donde X comprende uno o más aminoácidos no naturales. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos aquí pueden comprender Y, en donde Y comprende uno o más aminoácidos no naturales. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales. El aminoácido no natural puede reaccionar con el enlazador para crear un enlace químico.

30 [0165] El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un anticuerpo (p. ej., anticuerpo de Fórmula I, IA, II y IIA); intermedio (p. ej., intermedio de Fórmula III, IIIA, IV, IVA); Anticuerpo X o fragmento de anticuerpo; Y (p. ej., péptido); o una combinación de los mismos. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse específicamente en el sitio en un anticuerpo (p. ej., anticuerpo de Fórmula I, IA, II y IIA); intermedio (p. ej., intermedio de Fórmula III, IIIA, IV, IVA); Anticuerpo X o fragmento de anticuerpo; péptido Y; o una combinación de los mismos. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo (p. ej., anticuerpo de Fórmula I, IA, II y IIA); intermedio (p. ej., intermedio de Fórmula III, IIIA, IV, IVA); anticuerpo X o fragmento de anticuerpo; péptido Y; o una combinación de los mismos.

40 [0166] El uno o más aminoácidos no naturales se pueden incorporar en una cadena pesada, cadena ligera, la región variable, región constante, fragmento Fab de un anticuerpo (p. ej., anticuerpo de Fórmula I, IA, II, y II); intermedio (p. ej., intermedio de Fórmula III, IIIA, IV, IVA); anticuerpo X o fragmento de anticuerpo; péptido Y; o una combinación de los mismos.

45 [0167] El uno o más aminoácidos no naturales pueden insertarse entre dos aminoácidos naturales en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar uno o más aminoácidos naturales en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo N del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo C del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El aminoácido no natural puede incorporarse distal a la región de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El aminoácido no natural puede incorporarse cerca de la región de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El aminoácido no natural puede incorporarse en la región de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

50 [0168] El uno o más aminoácidos no naturales pueden insertarse entre dos aminoácidos naturales en el agente de focalización. El uno o más aminoácidos no naturales pueden reemplazar uno o más aminoácidos naturales en el agente de focalización. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo N del agente de focalización. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el extremo C del agente de focalización. El aminoácido no natural puede incorporarse distal a la región de unión del agente de focalización. El aminoácido no natural puede incorporarse cerca de la región de unión del agente de focalización. El aminoácido no natural puede incorporarse en la región de unión del agente de focalización.

60 [0169] El uno o más aminoácidos no naturales pueden estar codificados por un codón que no codifica uno de los veinte aminoácidos naturales. El uno o más aminoácidos no naturales pueden estar codificados por un codón sin sentido (codón de parada). El codón de parada puede ser un codón ámbar. El codón ámbar puede comprender una secuencia UAG. El codón de parada puede ser un codón ocre. El codón ocre puede comprender una secuencia UAA. El codón de parada puede ser un codón opal o umber. El codón opal o umber puede comprender una secuencia UGA. El uno o más aminoácidos no naturales pueden estar codificados por un codón de cuatro bases.

65

[0170] El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser *p*-acetilfenilalanina (pAcF o pAcPhe). El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser selenocisteína. El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser *p*-fluorofenilalanina (pFPhe). El uno o más aminoácidos no naturales pueden seleccionarse del grupo que comprende *p*-azidofenilalanina (pAZF), *p*-benzoilfenilalanina (pBpF), *p*-propargiloxifenilalanina (pPrF), *p*-yodofenilalanina (pIF), *p*-cianofenilalanina (pCNF), *p*-cianofenilalanina (pCNF)-carboximetilfenilalanina (pCmF), 3-(2-naftilo) alanina (NapA), *p*-boronofenilalanina (pBoF), *o*-nitrofenilalanina (oNiF), (8-hidroxiquinolina-3-ilo) alanina (HQA), selenocisteína y (2,2'-bipiridina-5-ilo)alanina (BipyA).

[0171] El uno o más aminoácidos no naturales pueden ser β -aminoácidos (β 3 y β 2), homo-aminoácidos, derivados de prolina y ácido pirúvico, derivados de alanina 3-sustituídos, derivados de glicina, derivados de fenilalanina sustituida en anillo y tirosina, aminoácidos de núcleo lineal, diaminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos de N-metilo, o una combinación de los mismos.

[0172] Ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a 1) diversos análogos de tirosina y fenilalanina sustituidos tales como *O*-metilo-L-tirosina, *p*-amino-L-fenilalanina, 3-nitro-L-tirosina, *p*-nitro-L-fenilalanina, *m*-metoxi-L-fenilalanina y *p*-isopropilo-L-fenilalanina; 2) aminoácidos con grupos arilo azida y benzofenona que pueden estar foto-reticulados; 3) aminoácidos que tienen una reactividad química única que incluye acetilo-L-fenilalanina y *m*-acetilo-L-fenilalanina, *O*-alilo-L-tirosina, *O*-(2-propinilo)-L-tirosina, *p*-etiltiocarbonilo-L-fenilalanina y *p*-(3-oxobutanoilo)-L-fenilalanina; 4) aminoácidos que contienen átomos pesados para la fase en la cristalografía de rayos X, incluyendo *p*-yodo y *p*-bromo-L-fenilalanina; 5) el aminoácido activo redox dihidroxi-L-fenilalanina; 6) aminoácidos glicosilados que incluyen b-N-acetilglucosamina-*O*-serina y a-N-acetilgalactosamina-*O*-treonina; 7) aminoácidos fluorescentes con cadenas laterales de naftilo, dansilo y 7-aminocoumarina; 8) aminoácidos fotoclavables y fotoisomerizables con cadenas laterales azobenceno y nitrobenzilo Cys, Ser y Tyr; 9) la fosfotirosina mimética *p*-carboximetilo-L-fenilalanina; 10) el homólogo de glutamina homoglutamina; y 11) ácido 2-aminooctanoico. El aminoácido no natural puede modificarse para incorporar un grupo químico. El aminoácido no natural puede modificarse para incorporar un grupo cetona.

[0173] El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender al menos un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo, hidroxilamina o una combinación de los mismos. El uno o más aminoácidos no naturales pueden comprender al menos un grupo carbonilo, dicarbonilo, alcoxi-amina, hidrazina, alqueno acíclico, alquino acíclico, ciclooctino, arilo/alquilo azida, norborneno, ciclopropeno, transcicloocteno o una combinación de tetrazina.

[0174] El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en X y/o Y por métodos conocidos en la técnica. Los sistemas basados en células o libres de células pueden usarse para alterar la secuencia genética de X y/o Y, produciendo así X y/o Y con uno o más aminoácidos no naturales. Se pueden usar cepas auxotróficas en lugar de ARNt y sintetasa modificadas genéticamente. El uno o más aminoácidos no naturales pueden producirse mediante reacción selectiva de uno o más aminoácidos naturales. La reacción selectiva puede estar mediada por una o más enzimas. En un ejemplo no limitante, la reacción selectiva de una o más cisteínas con la enzima generadora de formilglicina (FGE) puede producir una o más formilglicinas como se describe en Rabuka et al., Nature Protocols 7: 1052-1067 (2012).

[0175] El uno o más aminoácidos no naturales pueden participar en una reacción química para formar un enlazador. La reacción química para formar el enlazador puede ser una reacción bioortogonal. La reacción química para formar el enlazador puede ser química de clics.

[0176] Aminoácidos no naturales adicionales se describen en Liu et al. (Annu Rev Biochem, 79: 413-44, 2010), Wang et al. (Angew Chem Int Ed, 44: 34-66, 2005) y los números de solicitud PCT PCT/US2012/039472, PCT/US2012/039468, PCT/US2007/088009, PCT/US2009/058668, PCT/US2007/089142, PCT/US2007/088011, PCT/US2007/001485, PCT/US2006/049397, PCT/US2006/047822 y PCT/US2006/044682.

IV. Composiciones conjugadas de anticuerpos del agente de focalización

[0177] En el presente documento se describen composiciones que comprenden uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento. Las composiciones pueden comprender un agente conjugado de anticuerpo dirigido que comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende uno o más aminoácidos no naturales; (b) uno o más enlazadores; y (c) un agente de focalización, en donde el uno o más enlazadores vincula el anticuerpo o fragmento de anticuerpo al agente de focalización. El uno o más enlazadores vincula el anticuerpo o fragmento de anticuerpo al sitio del agente de focalización específicamente. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El agente de focalización puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. La composición puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además uno o más disolventes o diluyentes. La composición puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticos.

[0178] La composición puede comprender un agente conjugado de anticuerpo de Fórmula I: X-L1-Y, en donde (i) X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (ii) L1 comprende uno o más enlazadores; y (iii) Y comprende un agente de focalización. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos

específicamente al sitio por uno o más enlazadores. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos en el sitio de uno o más aminoácidos no naturales. La composición puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además uno o más disolventes o diluyentes. La composición puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticos.

[0179] La composición puede comprender un conjugado de anticuerpo del agente de focalización de Fórmula IA: Y-L1-X, en donde (i) X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (ii) L1 comprende uno o más enlazadores; y (iii) Y comprende un agente de focalización. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio por uno o más enlazadores. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos en el sitio de uno o más aminoácidos no naturales. La composición puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además uno o más disolventes o diluyentes. La composición puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticos.

[0180] La composición puede comprender un agente conjugado de anticuerpo de Fórmula II: X-L¹-L²-Y, en donde (i) X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (ii) L1 y L2 comprenden uno o más enlazadores; y (iii) Y comprende un agente de focalización. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio por uno o más enlazadores. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos en el sitio de uno o más aminoácidos no naturales. La composición puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además uno o más disolventes o diluyentes. La composición puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticos.

[0181] La composición puede comprender un conjugado de anticuerpo de agente de focalización de Fórmula IIA: Y-L2-L1-X, en donde (i) X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (ii) L1 y L2 comprenden uno o más enlazadores; y (iii) Y comprende un agente de focalización. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos específicamente al sitio por uno o más enlazadores. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender uno o más aminoácidos no naturales. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente de focalización pueden estar unidos en el sitio de uno o más aminoácidos no naturales. La composición puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición puede comprender además uno o más disolventes o diluyentes. La composición puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticos.

[0182] El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a un material que no anula la actividad biológica o las propiedades de los agentes descritos en el presente documento, y es relativamente no tóxico (es decir, la toxicidad del material supera significativamente el beneficio del material). En algunos casos, un material farmacéuticamente aceptable puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables significativos o interactuar significativamente de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en donde está contenido.

[0183] Las composiciones farmacéuticas en el presente documento pueden formularse utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que incluyen excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los agentes activos en preparaciones que se utilizan farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida. Un resumen de las composiciones farmacéuticas se encuentra, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania 1975; Liberman, HA y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, NY, 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Séptima Ed. (Lippincott Williams y Wilkins, 1999).

[0184] Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender además un diluyente(s), excipiente(s) o vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s). Las composiciones farmacéuticas pueden incluir otros agentes medicinales o farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de soluciones, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, las composiciones farmacéuticas también contienen otras sustancias terapéuticamente valiosas.

[0185] Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada, que incluye pero no se limita a, parenteral (intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravascular, intratecal, intravítrea, infusión o local), tópica, administración oral o nasal. Una ruta de administración adecuada puede comprender un dispositivo de microagujas.

[0186] Las formulaciones adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea, peritumoral o intravenosa pueden incluir soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente

aceptables, y polvos estériles para reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados que incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, cremóforo y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (como el aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se mantiene, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para inyección subcutánea también contienen aditivos opcionales tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores.

[0187] Para inyecciones intravenosas, un agente activo puede formularse opcionalmente en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico.

[0188] Las inyecciones parenterales implican opcionalmente inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se presentan opcionalmente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en una forma adecuada para inyección parenteral como suspensiones, soluciones o emulsiones estériles en vehículos aceitosos o acuosos, y contiene agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de un agente activo en forma soluble en agua. Además, las suspensiones se preparan opcionalmente como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas.

[0189] La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración única de dosificaciones precisas. En forma de dosificación unitaria, la formulación se puede dividir en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de un agente activo descrito aquí. La dosis unitaria puede estar en forma de un paquete que contiene cantidades discretas de la formulación. Ejemplos no limitantes son tabletas o cápsulas empaquetadas, y polvos en viales o ampollas. Las composiciones de suspensión acuosa se pueden envasar en recipientes de dosis única no reutilizables. Alternativamente, se usan recipientes con cierre de dosis múltiples, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición. Solo a modo de ejemplo, las formulaciones para inyección parenteral se presentan en forma de dosificación unitaria, que incluyen, pero no se limitan a ampollas, o en envases multidosis, con un conservante añadido.

[0190] La composición farmacéutica puede administrarse en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,1 mg/kg, 2,2 mg/kg, 2,3 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,5 mg/kg, 2,6 mg/kg, 2,7 mg/kg, 2,8 mg/kg, 2,9 mg/kg o aproximadamente 3,0 mg/kg. La composición farmacéutica se puede administrar a una dosis de aproximadamente 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg.

[0191] La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o más. La composición farmacéutica se puede administrar una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana o más. La composición farmacéutica puede administrarse quincenalmente. La composición farmacéutica puede administrarse mensualmente. La composición farmacéutica puede administrarse según sea necesario.

[0192] La composición farmacéutica puede administrarse conjuntamente con un tratamiento terapéutico. El tratamiento terapéutico puede comprender un tratamiento antiinflamatorio. El tratamiento antiinflamatorio puede comprender un esteroide. El tratamiento antiinflamatorio puede comprender un no esteroide. El tratamiento terapéutico puede comprender un antibiótico. El tratamiento terapéutico puede comprender un fármaco antiviral. El tratamiento terapéutico puede comprender una quimioterapia. El tratamiento terapéutico puede comprender una radiación. El tratamiento terapéutico puede comprender un anticuerpo bi-específico. El tratamiento terapéutico puede comprender un agente conjugado adicional de anticuerpo conjugado.

V. Métodos de producción de conjugado de anticuerpos del agente de focalización

[0193] En este documento se describen métodos para producir conjugado de anticuerpos del agente de focalización de Fórmula I: X-L1-Y o Fórmula IA: Y-L1-X. El método puede comprender acoplar uno o más enlazadores a Y, en donde Y comprende el agente de focalización, para producir un intermedio Y-L1 o L1-Y; y conjugando el intermedio con X, en donde X comprende al menos una porción de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, produciendo así el conjugado de anticuerpo del agente de focalización. El método puede comprender además conjugar el intermedio a X y/o Y específicamente en el sitio. El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en X y/o Y. Alternativamente, el método puede comprender acoplar uno o más enlazadores al anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un intermedio X-L1 o L1X, y conjugar el intermedio a Y, en donde Y comprende un agente de focalización, produciendo así el conjugado del anticuerpo del agente de focalización. La conjugación del intermedio X-L1 o L1X al agente de focalización puede comprender formar una oxima. La formación de una oxima puede requerir condiciones ácidas. El método puede comprender además conjugar el intermedio a X y/o Y específicamente en el sitio. El método puede comprender además incorporar uno o más aminoácidos no naturales en

X y/o Y.

[0194] Se describe adicionalmente en el presente documento un método para producir el conjugado de anticuerpo del agente de focalización de Fórmula II: X-L1-L2-Y, que comprende (a) incorporando uno o más aminoácidos no naturales en X y/o Y, en donde (i) X comprende al menos una porción de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y (ii) Y comprende al menos una porción de un péptido o proteína; (b) acoplar L1 a X para producir un primer intermedio de Fórmula III: X-L1 y acoplar L2 a Y para producir un segundo intermedio de Fórmula IV: L2 -Y; y (c) unir el primer intermedio de Fórmula III al segundo intermedio de Fórmula IV, produciendo así el conjugado de anticuerpo del agente de focalización de Fórmula II.

[0195] El método para producir el conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además diseñar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El método puede comprender además incorporar un codón sin sentido en el ácido nucleico. El codón sin sentido puede ser un codón ámbar. El método puede comprender además incorporar un aminoácido no natural en el sitio de ácido nucleico específicamente. El método puede comprender además incorporar un aminoácido no natural en el ácido nucleico en el codón sin sentido. El método puede comprender además expresar el ácido nucleico en una célula. El método puede comprender además coexpresar un par de ARNt/tirosilo-ARNt sintetasa ortogonal. El par de ARNt/tirosilo-ARNt sintetasa ortogonal puede incorporar el aminoácido no natural selectivamente en respuesta al codón sin sentido

VA. Incorporación de aminoácidos no naturales

[0196] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La modificación de uno o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender mutar uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el agente de focalización. La mutación del uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el agente de focalización puede comprender alterar un codón que codifica un aminoácido a un codón sin sentido.

[0197] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácidos en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir uno o más codones ámbar en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0198] El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en respuesta a un codón ámbar. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse específicamente en el sitio en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0199] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender el uso de uno o más aminoácidos no naturales genéticamente codificados con reactividad química ortogonal en relación con los veinte aminoácidos canónicos para modificar específicamente el agente de focalización. La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales puede comprender el uso de un par de ARNt/aminoacilo-ARNt sintetasa evolucionado para incorporar específicamente uno o más aminoácidos no naturales en sitios definidos en el agente de focalización en respuesta a uno o más codones sin sentido ámbar.

[0200] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un agente de focalización puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácidos en un agente de focalización. La modificación de uno o más residuos de aminoácidos en un agente de focalización puede comprender la mutación de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el agente de focalización. La mutación del uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el agente de focalización puede comprender alterar un codón que codifica un aminoácido a un codón sin sentido.

[0201] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un agente de focalización puede comprender modificar uno o más residuos de aminoácidos en un agente de focalización para producir uno o más codones ámbar en un agente de focalización.

[0202] El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse en un agente de focalización en respuesta a un ámbar codón. El uno o más aminoácidos no naturales pueden incorporarse específicamente en el sitio en un agente de focalización.

[0203] La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un agente de focalización puede comprender el uso de uno o más aminoácidos no naturales codificados genéticamente con reactividad química ortogonal en relación con los veinte aminoácidos canónicos para modificar específicamente el agente de focalización. La incorporación de uno o más aminoácidos no naturales puede comprender el uso de un par de ARNt/aminoacilo-ARNt sintetasa evolucionado para incorporar específicamente uno o más aminoácidos no naturales en sitios definidos en el agente de focalización en respuesta a uno o más codones sin sentido ámbar.

[0204] Los métodos adicionales para incorporar aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en Chatterjee et al. (A Versatile Platform for Single- and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in

Escherichia coli, Biochemistry, 2013), Kazane et al. (J Am Chem Soc, 135 (1): 340-6, 2013), Kim et al. (J Am Chem Soc, 134 (24): 9918-21, 2012), Johnson et al. (Nat Chem Biol, 7 (11): 779-86, 2011) y Hutchins et al. (J Mol Biol, 406 (4): 595-603, 2011).

5 VB. Acoplamiento de enlazadores

10 **[0205]** Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender acoplar uno o más enlazadores a uno o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, agentes de focalización o combinaciones de los mismos para producir uno o más intermedios tales como un intermedio enlazador de anticuerpos, un intermedio enlazador de fragmento de anticuerpo y/o un intermedio enlazador de conjugado de anticuerpo de agente de focalización. Los métodos pueden comprender acoplar un primer enlazador a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un intermedio enlazador de anticuerpos o un intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos. Los métodos pueden comprender acoplar un enlazador a un agente de focalización para producir un agente intermedio de enlace al agente de focalización.

15 **[0206]** El acoplamiento del uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede ocurrir simultáneamente. El acoplamiento del uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula de focalización puede ocurrir secuencialmente. El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula de focalización puede ocurrir en un solo volumen de reacción. El acoplamiento del uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula de focalización puede ocurrir en dos o más volúmenes de reacción.

20 **[0207]** El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o molécula de focalización puede comprender formar una o más oximas entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula de focalización. El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender formar uno o más enlaces estables entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización. El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender formar uno o más enlaces covalentes entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización. El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o agente de focalización puede comprender formar uno o más enlaces no covalentes entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización. El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo, fragmento de anticuerpo y/o ligando puede comprender formar uno o más enlaces iónicos entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización.

25 **[0208]** El acoplamiento de uno o más enlazadores al anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender un sitio que acople específicamente uno o más enlazadores al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El acoplamiento específico del sitio puede comprender unir uno o más enlazadores al aminoácido no natural del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La vinculación de uno o más enlazadores al aminoácido no natural del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender la formación de una oxima. La vinculación del uno o más enlazadores al aminoácido no natural del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender, a modo de ejemplo no limitativo, hacer reaccionar una hidroxilamina del uno o más enlazadores con un aldehído o cetona de un aminoácido. El aminoácido puede ser un aminoácido no natural.

30 VC. Vinculación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o agentes de focalización

35 **[0209]** Los métodos pueden comprender unir el anticuerpo, fragmento de anticuerpo, agente de focalización o intermedios del mismo para producir un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; (b) uno o más enlazadores; y (c) un agente de focalización, en donde uno o más enlazadores unen el primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo al agente de focalización. El método puede comprender además conjugar uno o más enlazadores con un agente de focalización para producir un intermediario de agente de focalización (Y-L1 o L1-Y) y acoplar el intermediario de agente de focalización al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El método puede comprender además conjugar uno o más enlazadores con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un intermedio enlazador de anticuerpos o un intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L1 o L1-X) y acoplar el intermedio enlazador de anticuerpos o intermedio de enlace de fragmento de anticuerpo al agente de focalización. El acoplamiento de un producto intermedio a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede comprender la formación de una oxima. El acoplamiento de un producto intermedio a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede comprender la formación de la oxima en una solución ácida. El acoplamiento de un producto intermedio a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede comprender la formación de la oxima en una solución ligeramente ácida. El acoplamiento de un producto intermedio a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede comprender la formación de la oxima en una solución ligeramente neutra. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender un aminoácido no natural. La vinculación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con el intermedio del agente de enlace-enlazador puede comprender formar una oxima entre el aminoácido no natural y el intermedio del agente de agente-enlazador. El agente de focalización puede comprender un aminoácido no natural. La vinculación del agente de focalización con el intermedio enlazador de anticuerpos o el intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos puede comprender formar una oxima entre el aminoácido no natural y el intermedio enlazador de anticuerpos o el

intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos.

El método para producir un agente conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender (a) conjugar un primer enlazador (L1) al anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un intermedio enlazador de anticuerpos o un intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L1 o L1 -X); (b) conjugar un segundo enlazador (L2) con el agente de focalización para producir un intermedio de enlazador de agente de focalización (Y- L2 o L2 -Y); y (c) unir los dos intermedios para producir el conjugado de anticuerpo del agente de focalización, X- L1-L2-Y o Y- L2- LX. La conjugación del enlazador con el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización puede comprender la producción de un enlace iónico, un enlace covalente, un enlace no covalente o una combinación de los mismos entre el enlazador y el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización. La conjugación del enlazador con el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el agente de focalización se puede realizar como se describe en Roberts et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 459-476 (2002). L1 y/o L2 pueden comprender un enlazador seleccionado de un enlazador bifuncional, un enlazador escindible, un enlazador no escindible, un enlazador de etilenglicol, un enlazador bifuncional de etilenglicol, un enlazador flexible o un enlazador inflexible. L1 y/o L2 pueden comprender un enlazador seleccionado del grupo que comprende ciclooctino, ciclopropeno, arilo/alquilo azidas, transcicloocteno, norboreno y tetrazinas. Un término de L1 y/o un término de L2 puede comprender una alcoxi-amina. Un término de L1 y/o un término de L2 puede comprender un grupo azida o ciclooctino. X puede estar acoplado a L1 por un grupo químico seleccionado entre un ciclooctino, ciclopropeno, arilo/alquilo azida, transcicloocteno, norboreno y tetrazina. La vinculación del intermedio enlazador de anticuerpos o el intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L¹ o L¹-X) y el intermedio enlazador del agente de focalización (Y- L2 o L2 -Y) pueden comprender conducir una o más reacciones sin cobre. Enlazar el intermedio enlazador de anticuerpos o el intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos (X- L1 o L1 -X) y el intermedio enlazador de agente de focalización (Y- L2 o L2 -Y) puede comprender conducir una o más reacciones que contienen cobre. La vinculación del intermedio de enlazador de anticuerpos o el intermedio de enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L1 o L1 -X) y el intermedio de enlazador de agente de focalización (Y- L2 o L2 -Y) pueden comprender una o más cicloadiciones. La vinculación del intermedio de enlazador de anticuerpos o el intermedio de enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L1 o L1-X) y el intermedio de enlazador de agente de focalización (Y- L2 o L2-Y) pueden comprender una o más cicloadiciones de Huisgen. La vinculación del intermedio de enlazador de anticuerpos o el intermedio de enlazador de fragmentos de anticuerpos (X- L1 o L1 -X) y el intermedio de enlazador de agente de focalización (Y- L2 o L2-Y) pueden comprender una o más reacciones de Diels Alder. La vinculación del intermedio enlazador de anticuerpos o el intermedio enlazador de fragmentos de anticuerpos (X-L1 o L1-X) y el intermedio enlazador del agente de focalización (Y-L2 o L2-Y) puede comprender una o más reacciones de Hetero Diels Alder.

VD. Purificación de anticuerpos

[0210] Los métodos pueden comprender además purificar el conjugado de anticuerpos del agente de focalización que comprende (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende uno o más aminoácidos no naturales; (b) un agente de focalización; y (c) uno o más enlazadores, en donde el uno o más enlazadores enlazan el anticuerpo o fragmento de anticuerpo al agente de focalización. Los métodos pueden comprender además purificar uno o más intermedios del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de focalización (p. ej., enlazador de anticuerpo, enlazador de fragmento de anticuerpo o molécula enlazadora de ligando). La purificación del anticuerpo o productos intermedios puede comprender la eliminación del exceso de enlazadores, anticuerpos no unidos, fragmentos de anticuerpos no unidos o ligandos no unidos. La purificación del anticuerpo o intermedios puede comprender el uso de una o más columnas concentradoras, electroforesis, filtración, centrifugación, cromatografía o una combinación de las mismas. La cromatografía puede comprender cromatografía de exclusión por tamaño. Los métodos de cromatografía adicionales incluyen, entre otros, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, unión de metales, cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía líquida de alta presión. La electroforesis puede comprender electroforesis desnaturalizante o electroforesis no desnaturalizante.

[0211] Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, agentes de focalización o intermedios pueden comprender una o más etiquetas. Los enlazadores pueden comprender una o más etiquetas. Las etiquetas pueden usarse para purificar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, agentes de focalización o intermedios. La una o más etiquetas pueden ser escindidas por una o más proteasas. Los ejemplos de etiquetas incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, FLAG, HA, c-myc, V5, proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión-S-transferasa (GST).

[0212] Los métodos pueden comprender además liofilización o ultracentrifugación de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, agentes de focalización o intermedios.

[0213] La pureza del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La pureza del anticuerpo puede ser igual o superior al 85%. La pureza del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 90%. La pureza del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o superior al 95%. La pureza del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 97%.

[0214] La pureza del intermedio (p. ej., enlazador de anticuerpos, enlazador de fragmentos de anticuerpos, enlazador de agente de focalización) puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La pureza del intermedio puede ser igual o mayor que 85%. La pureza del intermedio puede ser igual o mayor que 90%. La pureza del intermedio puede ser igual o mayor que 95%. La pureza del intermedio puede ser igual o mayor que 97%.

5 **[0215]** La pureza del agente de focalización puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La pureza del agente de focalización puede ser igual o superior al 85%. La pureza del agente de focalización puede ser igual o superior al 90%. La pureza del agente de focalización puede ser igual o superior al 95%. La pureza del agente de focalización puede ser igual o superior al 97%.

10 **[0216]** La homogeneidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La homogeneidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o superior al 85%. La homogeneidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 90%. La homogeneidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o superior al 95%. La homogeneidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser igual o mayor que 97%.

15 **[0217]** La homogeneidad del intermedio (p. ej., enlazador de anticuerpos, enlazador de fragmentos de anticuerpos, enlazador de agente de focalización) puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La homogeneidad del anticuerpo puede ser igual o mayor que 85%. La homogeneidad del anticuerpo puede ser igual o mayor que 90%. La homogeneidad del anticuerpo puede ser igual o superior al 95%. La homogeneidad del anticuerpo puede ser igual o mayor que 97%.

20 **[0218]** La homogeneidad del agente de focalización puede ser igual o mayor que 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. La homogeneidad del agente de focalización puede ser igual o superior al 85%. La homogeneidad del agente de focalización puede ser igual o superior al 90%. La homogeneidad del agente de focalización puede ser igual o superior al 95%. La homogeneidad del agente de focalización puede ser igual o mayor que 97%.

VI. Células

30 **[0219]** Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en el presente documento pueden unirse a uno o más receptores, correceptores, antígenos o marcadores celulares en una o más células. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden comprender (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y (b) un agente de focalización, en donde (i) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una primera célula; (ii) el agente de focalización se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una segunda célula; o (iii) una combinación de (i) y (ii), y en donde (iv) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende uno o más aminoácidos no naturales; (v) el agente de focalización comprende uno o más aminoácidos no naturales; o (vi) una combinación de (iv) y (v). La primera célula puede ser una célula efectora citotóxica. La segunda célula puede ser una célula diana. En general, la unión de la célula efectora citotóxica y la célula diana a la construcción del anticuerpo del agente de focalización lleva a la célula diana a una proximidad con la célula efectora citotóxica que está suficientemente cerca para que una actividad de la célula efectora citotóxica tenga un efecto en la célula diana. Por ejemplo, cuando la célula efectora citotóxica y la célula diana están unidas al conjugado de anticuerpos del agente de focalización, la célula efectora citotóxica puede liberar citocinas que se unen a los receptores de citocinas en la célula diana.

40 **[0220]** La célula efectora citotóxica puede ser una célula citotóxica. La célula citotóxica puede ser una célula hematopoyética. La célula hematopoyética puede ser un macrófago, un neutrófilo, un eosinófilo, una célula NK, una célula B o una célula T. La célula hematopoyética puede ser una célula T. La célula T puede ser una célula T citotóxica. La célula T puede ser una célula T asesina natural.

50 **[0221]** La célula diana puede ser una célula cancerosa. La célula diana puede ser una célula tumoral. La célula diana puede ser una célula leucémica. La célula diana puede ser una célula linfómica. La célula diana puede ser una célula metastásica. La célula diana puede modificarse genéticamente. La célula diana puede comprender una mutación genética. La mutación genética puede comprender una mutación oncogénica. La mutación genética puede ser una mutación de un gen supresor de tumores. La mutación genética puede ser una mutación de un protooncogen. La célula diana puede ser una célula inflamatoria. La célula diana puede ser una célula infectada. La célula diana puede ser una célula patógena.

60 **[0222]** La primera célula y la segunda célula pueden ser del mismo tipo de célula. La primera célula y la segunda célula pueden ser diferentes tipos de células. Alternativamente, la primera célula y la segunda célula pueden ser la misma célula. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede unirse o interactuar con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en más de dos tipos de células diferentes. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse o interactuar con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en dos o más tipos de células diferentes. El agente de focalización puede unirse o interactuar con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en dos o más tipos de células diferentes. Los diferentes tipos de células pueden diferir según su linaje celular. Los diferentes tipos de células pueden diferir según su función. Los diferentes tipos de células pueden

diferir según la expresión de una o más proteínas. Los diferentes tipos de células pueden diferir según su morfología. Los diferentes tipos de células pueden diferir según su ubicación. Los diferentes tipos de células pueden diferir según su genotipo. Los diferentes tipos de células pueden diferir por una sola mutación genética. Los diferentes tipos de células pueden diferir en más de una mutación genética.

5 [0223] La una o más células pueden comprender células hematopoyéticas. Las células hematopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, mielocitos basófilos, basófilos, células B, unidad de formación de estallido eritroide (BFU-E), unidad de formación de estallidos megacariocitos (BFUMk), unidad de formación de colonias basófilos (CFU-Bas), unidad de formación de colonias eritroide (CFU-E), unidad de formación de colonias eosinófilos (CFU-Eo), unidad de
10 formación de colonias granulocitos (CFU-G), unidad de formación de colonias macrófagos de monocitos de eritrocitos (CFU-GEMM), unidad de formación de colonias macrófagos de granulocitos (CFU-GM), colonia que forma megacariocitos unidos (CFU-Mk, CFU-MEG), progenitora dendrítica común, células progenitoras linfoides comunes, progenitores mieloides comunes, progenitores mieloides comunes, progenitores mieloides linfoides comunes, células 1 (DN1) negativas, células DN2, células DN3, células DN4, células doble positivas (células DP), mielocitos
15 eosinófilos, eosinófilos, eritrocitos, células madre linfoides, células dendríticas relacionadas con linfoides, macrófagos, mastocitos, megacariocitos, células B de memoria, células de memoria, células T de memoria, monoblastos, monocitos, mieloblastos, células madre mieloides, células dendríticas relacionadas con mieloides, mielocitos neutrófilos, neutrófilos, células asesinas naturales (células NK), células T asesinas naturales (células NKT), plaquetas, células pro-B1, células pro-B-2, células pro-B, proeritroblastos, promonocitos, células T reguladoras (Tregs), células
20 T, células T-ayudantes (Th), células Th0, células Th1, células Th2, células Th3, células Th17. BFU-E o CFU-E pueden referirse a células precursoras eritroides que pueden diferenciarse en eritrocitos. Las células CFU-E pueden estar más desarrolladas que las células BFU-E. CFU-Eo puede referirse al tipo de desarrollo de células formadoras de sangre que pueden convertirse en eosinófilos. CFU-G puede referirse a un tipo de desarrollo de células formadoras de sangre que pueden ser precursoras de granulocitos. CFU-GEMM puede referirse a un tipo pluripotente de células precursoras
25 en el linaje de células formadoras de sangre que pueden diferenciarse en granulocitos, eritrocitos, monocitos y/o macrófagos. CFU-GM puede referirse a un tipo pluropotente de células precursoras en el linaje de las células formadoras de sangre que pueden diferenciarse en granulocitos y/o macrófagos. BFU-Mk, CFU-Mk o CFU-MEG pueden referirse a células precursoras que pueden diferenciarse en megacariocitos. Las células CFU-Mk o CFU-MEG pueden estar más desarrolladas que las células BFU-Mk.

30 [0224] La una o más células pueden ser de un órgano o tejido. El órgano puede ser un órgano de glándula. El órgano puede ser un órgano del sistema digestivo o endocrino. El órgano puede ser tanto una glándula endocrina como un órgano digestivo. El órgano puede derivarse de endodermo, ectodermo, endodermo primitivo o mesodermo. El órgano puede ser una glándula suprarrenal. En algunos casos, la glándula suprarrenal comprende células cromafines o
35 células ganglionares. Alternativamente, el órgano es un apéndice, vejiga o cerebro. En algunos casos, el cerebro comprende neuronas (p. ej., células nerviosas) o células gliales. Las células gliales incluyen, entre otras, astrocitos, oligodendrocitos y células endodiales. En algunos casos, el órgano es un oído, esófago, ojo o vesícula biliar. La vesícula biliar comprende colecistocitos. El órgano puede ser un riñón. El riñón puede comprender una célula parietal del glomérulo renal, un podocito de glomérulo renal, una célula del borde del cepillo del túbulo proximal del riñón, una
40 célula del segmento delgado del asa de Henle, una célula gruesa del miembro ascendente, una célula del túbulo distal del riñón, una célula ductal colectora de riñón o una célula del riñón intersticial. En algunos casos, el órgano es un intestino grueso y el intestino grueso puede comprender enterocitos, células caliciformes, células de mechones caveolados, células enteroendocrinas o neuronas ganglionares. El órgano puede ser un hígado. El hígado puede comprender células parenquimatosas o no parenquimatosas. Los ejemplos de células parenquimatosas comprenden hepatocitos. Las células no parenquimatosas incluyen, pero no se limitan a, células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y células estrelladas hepáticas. En algunos casos, el órgano es un pulmón, boca, nariz, glándula paratiroides, glándula pineal, glándula pituitaria, piel, intestino delgado, estómago, bazo, timo, glándula tiroides, tráquea, útero o apéndice vermiforme. En algunos casos, el órgano puede ser un corazón. En algunos casos, el
45 corazón comprende cardiomiocitos. En algunos casos, el órgano es un músculo (p. ej., músculo cardíaco, músculo esquelético, músculo liso, etc.). El músculo puede comprender miocitos.

50 [0225] En algunos casos, las células son de un tejido. El tejido puede ser un tejido conectivo, epitelial, muscular o nervioso. Alternativamente, el tejido es un hueso, tendón (ambos denominados injertos musculoesqueléticos), córnea, piel, válvula cardíaca o vena.

55 [0226] El tejido conectivo puede ser un tejido fibroso y a menudo se encuentra en todo el cuerpo. Los ejemplos de tejidos conectivos incluyen, entre otros, tejido conectivo, tejido graso, tejido fibroso denso, cartílago, hueso, sangre y linfa. En general, el tejido conectivo tiene tres componentes principales: células, fibras y matriz extracelular, que pueden estar incrustadas en los fluidos corporales. Los fibroblastos son a menudo las células responsables de la
60 producción de tejido conectivo. La interacción de las fibras, la matriz extracelular y el agua, juntas, pueden formar el tejido conectivo flexible en su conjunto. El tejido conectivo puede formar una variedad de estructuras físicas, incluidos los tendones y el marco conectivo de las fibras en los músculos, cápsulas y ligamentos alrededor de las articulaciones, cartílagos, huesos, tejido adiposo, sangre y tejido linfático. El tejido conectivo (TC) se puede clasificar en tres subtipos: TC embrionaria, TC adecuada y TC especial. El subtipo de TC adecuado puede incluir TC regular densa, TC irregular densa y TC suelta. El subtipo especial de TC puede incluir cartílago, hueso, tejido adiposo, sangre, tejido
65 hematopoyético y tejido linfático.

[0227] A menudo los tejidos conectivos tienen distintas funciones, características y composiciones. Las funciones del tejido conectivo pueden incluir el almacenamiento de energía, la protección de los órganos, proporcionar un marco estructural para el cuerpo y la conexión de los tejidos del cuerpo. El tejido conectivo puede caracterizarse por células que se propagan a través de un líquido extracelular. En algunos casos, el tejido conectivo puede comprender una sustancia fundamental, que a menudo es un líquido transparente, incoloro y viscoso que contiene glucosaminoglucanos y proteoglucanos. La sustancia del suelo puede fijar el agua corporal y las fibras de colágeno en los espacios intercelulares. La sustancia del suelo también puede retrasar la propagación de agentes patógenos.

[0228] El tejido conectivo puede ser fibroso y el tejido fibroso puede comprender distintas composiciones y estar localizado en áreas específicas del cuerpo. Por ejemplo, las fibras de colágeno a menudo contienen cadenas de polipéptidos alfa y pueden localizarse principalmente en un tendón, ligamento, piel, córnea, cartílago, hueso, vasos sanguíneos, intestino y disco intervertebral. En otro ejemplo, las fibras elásticas pueden comprender microfibrilla elástica y elastina y pueden localizarse principalmente en una matriz extracelular. Las fibras reticulares son otro ejemplo de tejido fibroso y pueden localizarse en el hígado, la médula ósea o los órganos linfáticos.

[0229] Sin embargo, no todos los tipos de tejidos conectivos son fibrosos. Ejemplos de tejidos conectivos no fibrosos son el tejido adiposo y la sangre. El tejido adiposo puede proporcionar una "amortiguación mecánica" a nuestro cuerpo. Aunque a menudo no hay una red de colágeno densa en el tejido adiposo, las fibras de colágeno y las láminas de colágeno pueden mantener juntos grupos de células adiposas para mantener el tejido graso bajo compresión en su lugar (p. ej., la planta del pie).

[0230] Los epitelios son tejidos que pueden consistir en células estrechamente interpuestas sin intervenir sustancias intercelulares. Los epitelios a menudo son avasculares, pero los epitelios pueden "crecer" en una capa subyacente de tejido conectivo vascular. El tejido conectivo y el epitelio pueden estar separados por una membrana basal. El epitelio puede cubrir todas las superficies libres del cuerpo. El epitelio también puede cubrir las grandes cavidades internas del cuerpo, donde se denomina mesotelio. Además, las superficies internas de los vasos sanguíneos y linfáticos pueden estar revestidas por epitelio, aquí denominado endotelio. Los epitelios a menudo se clasifican en función del número de capas celulares y la forma de las células en la capa superficial. Si solo hay una capa de células en el epitelio, se designa como simple. Si hay dos o más capas de células, se denomina estratificado. Las células en la capa superficial pueden describirse según su altura como escamosas (en forma de escamas o placas), cuboidales o columnares.

[0231] Los diferentes tipos de tejidos epiteliales pueden tener funciones y ubicaciones especializadas dentro del cuerpo. Por ejemplo, la columna pseudoestratificada puede funcionar para eliminar el polvo y las partículas de las vías respiratorias y puede tener cilios. La columna pseudoestratificada puede revestir los conductos respiratorios. La columna simple puede estar involucrada en la absorción y, a menudo, recubre el útero y la mayoría de los órganos del tracto digestivo. El cuboidal simple puede estar involucrado en la secreción y absorción y puede localizarse en glándulas, túbulos renales y ovarios. Los escamosos simples pueden desempeñar un papel en la difusión y filtración y pueden localizarse en pulmones, paredes de capilares y vasos. El escamoso estratificado puede proteger las células subyacentes y a menudo se localiza en la piel, la garganta, la vagina y la boca. El cuboidal estratificado puede estar involucrado en la protección y puede cubrir los conductos de las glándulas mamarias, las glándulas sudoríparas y el páncreas. El columnar estratificado puede estar involucrado en la protección y secreción y puede localizarse en la uretra masculina y el conducto deferente, y partes de la faringe.

[0232] El tejido muscular es a menudo un tejido contráctil y puede derivarse de la capa mesodérmica de células germinales embrionarias. Las células musculares pueden contener filamentos contráctiles que se mueven entre sí y cambian el tamaño de la célula. Se clasifican en músculos esqueléticos, cardíacos o lisos. El músculo esquelético o "músculo voluntario" puede estar anclado por los tendones (o por aponeurosis en algunos lugares) al hueso y puede usarse para efectuar el movimiento esquelético como la locomoción y para mantener la postura. El músculo liso o "músculo involuntario" a menudo se encuentra dentro de las paredes de los órganos y estructuras como el esófago, el estómago, los intestinos, los bronquios, el útero, la uretra, la vejiga, los vasos sanguíneos y el retractor pili en la piel (en la cual controla la erección del vello corporal). El músculo cardíaco también es un "músculo involuntario", pero puede ser más estructuralmente similar al músculo esquelético, y a menudo se encuentra en el corazón.

[0233] Los músculos cardíacos y esqueléticos a menudo están "estriados" en el sentido de que contienen sarcómeros y están agrupados en arreglos muy regulares de haces. Si bien los músculos esqueléticos pueden estar dispuestos en haces regulares paralelos, el músculo cardíaco a menudo se conecta en ángulos ramificados e irregulares (llamados discos intercalados). El músculo estriado puede contraerse y relajarse en ráfagas cortas e intensas, mientras que el músculo liso puede sufrir contracciones más largas o incluso casi permanentes.

[0234] El músculo esquelético puede dividirse en varios subtipos. El músculo tipo I, oxidativo lento, contracción lenta o "rojo" a menudo es denso con capilares y puede ser rico en mitocondrias y mioglobina, lo que le da al tejido muscular su color rojo característico. Puede transportar más oxígeno y mantener la actividad aeróbica. Tipo II, músculo de contracción rápida, tiene tres tipos principales, Tipo IIa, Tipo IIx y Tipo IIb. El tipo IIa es a menudo aeróbico y puede ser rico en mitocondrias y capilares y puede aparecer rojo. Tipo IIx (también conocido como tipo IIc), que a menudo es menos denso en mitocondrias y mioglobina. Tipo IIb, que puede ser un músculo "blanco" anaeróbico, glucolítico,

que a menudo es aún menos denso en las mitocondrias y la mioglobina.

[0235] El tejido nervioso es una de las cuatro clases principales de tejido. El tejido nervioso es a menudo el componente principal del sistema nervioso, el cerebro, la médula espinal y los nervios, que pueden regular y controlar las funciones del cuerpo. El tejido nervioso a menudo está compuesto de neuronas y células de neuroglia. Las neuronas pueden transmitir impulsos. Las células neurogliales pueden ayudar en la propagación del impulso nervioso y proporcionar nutrientes a la neurona. El tejido nervioso a menudo está formado por células nerviosas que pueden existir en muchas variedades, todas las cuales pueden caracterizarse claramente por el axón o el tallo largo como parte de la célula que envía señales de potencial de acción a la siguiente célula.

[0236] Las funciones del sistema nervioso pueden incluir información sensorial, integración, controles de músculos y glándulas, homeostasis y actividad mental. El tejido nervioso puede reaccionar a los estímulos y puede conducir impulsos a varios órganos del cuerpo que a menudo provocan una respuesta al estímulo. El tejido nervioso (como en el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos que se ramifican por todo el cuerpo) a menudo están formados por células nerviosas especializadas llamadas neuronas. Las neuronas se estimulan fácilmente y transmiten impulsos muy rápidamente. Un nervio a menudo comprende muchas fibras de células nerviosas (neuronas) unidas por tejido conectivo. Una vaina de tejido conectivo denso, el epineuro, puede rodear el nervio. Esta vaina penetra el nervio para formar el perineuro que rodea los haces de fibras nerviosas. Se pueden ver vasos sanguíneos de varios tamaños en el epineuro. El endoneuro, que consiste en una capa delgada de tejido conectivo laxo, rodea las fibras nerviosas individuales.

[0237] El cuerpo celular puede estar encerrado por una membrana celular (plasma) y puede tener un núcleo central. Gránulos llamados cuerpos de Nissl a menudo se encuentran en el citoplasma del cuerpo celular. Dentro del cuerpo celular, las neurofibrillas extremadamente finas pueden extenderse desde las dendritas al axón. El axón a menudo está rodeado por la vaina de mielina, que forma una capa de grasa blanquecina, no celular, alrededor del axón. Fuera de la vaina de mielina puede haber una capa celular llamada neurilema o vaina de las células de Schwann. La vaina de mielina junto con el neurilema también se conoce como vaina medular. Esta vaina medular puede ser interrumpida a intervalos por los nodos de Ranvier.

[0238] Las neuronas pueden clasificarse tanto estructural como funcionalmente. La clasificación estructural puede agrupar las neuronas de acuerdo con el número de procesos que se extienden desde su cuerpo celular. Tres grupos neuronales principales a menudo componen esta clasificación: neuronas multipolares (polares = extremos, polos), bipolares y unipolares. Las neuronas multipolares a menudo tienen tres o más procesos. Estos son el tipo de neurona más común en humanos (más del 99% de las neuronas pertenecen a esta clase) y el tipo de neurona principal en el SNC. Las neuronas bipolares a menudo tienen forma de huso, con una dendrita en un extremo y un axón en el otro. Se puede encontrar un ejemplo en la retina sensible a la luz del ojo. Las neuronas unipolares a menudo comprenden neuronas sensoriales. Las neuronas sensoriales normalmente tienen un solo proceso o fibra que se divide cerca del cuerpo celular en dos ramas principales (axón y dendrita).

[0239] Las células también pueden comprender folículos pilosos, células ciliadas, células ciliadas del oído, células madre del pelo del oído o células cocleares. Las células ciliadas son a menudo los receptores sensoriales tanto del sistema auditivo como del sistema vestibular. Las células ciliadas auditivas pueden ubicarse dentro del órgano de Corti en una membrana basilar delgada en la cóclea del oído interno. Las células ciliadas cocleares pueden presentarse en dos tipos distintos anatómicamente y funcionalmente: las células ciliadas externas e internas.

[0240] Una o más células pueden ser una célula patógena. Las células patógenas incluyen, pero no se limitan a, bacterias, virus, hongos y protozoos. Los ejemplos de patógenos pueden incluir, entre otros, las bacterias, virus, hongos y protozoos descritos aquí.

VII. Receptores, correceptores, antígenos y marcadores celulares

[0241] Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden unirse a uno o más receptores, correceptores, antígenos o marcadores celulares en una o más células. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden comprender (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y (b) agente de focalización, en donde (i) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una primera célula; (ii) el agente de focalización se une o interactúa con un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una segunda célula; o (iii) una combinación de (i) y (ii), y en donde (iv) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende uno o más aminoácidos no naturales; (v) el agente de focalización comprende uno o más aminoácidos no naturales; o (vi) una combinación de (iv) y (v). La primera célula y la segunda célula pueden ser del mismo tipo de célula. La primera célula y la segunda célula pueden ser diferentes tipos de células. Alternativamente, la primera célula y la segunda célula pueden ser la misma célula.

[0242] Por ejemplo, para un conjugado de anticuerpo de agente de focalización de Fórmula I, IA, II y/o IIA, X comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede unirse a un receptor, correceptor, antígeno, proteína transmembrana o marcador celular. Alternativamente, o adicionalmente, para un conjugado de anticuerpo del agente de focalización de Fórmula I, IA, II y/o IIA, Y comprende un agente de focalización que puede unirse a un receptor,

correceptor, antígeno o marcador celular.

5 [0243] Los ejemplos de receptores, correceptores, antígenos o marcadores celulares pueden incluir, entre otros, un receptor, correceptor, antígeno o marcador celular en una célula hematopoyética, célula de tejido, célula epitelial, célula mesotelial, célula dérmica, célula endotelial, célula dendrítica, célula vascular, célula del estroma, neurona, célula cancerosa, bacteria, hongo o virus. Los receptores, correceptores, antígenos o marcadores celulares pueden seleccionarse del grupo que comprende MUC16, GPNMB, Cripto, ED-8, TMEFF2, EphB2, EphA2, FAP, mesotelina, TAG-72, GD2, CAIX y 5T4.

10 [0244] El receptor, correceptor, antígeno o marcador celular puede sobreexpresarse en una célula de cáncer de próstata. Los receptores, correceptores, antígenos o marcadores celulares pueden comprender una endotelina. El receptor, correceptor, antígeno o marcador celular puede ser PSMA.

15 [0245] El receptor puede ser un receptor acoplado a proteína G (GPCR). El receptor puede ser un receptor de tirosina quinasa. El receptor puede ser un receptor de citoquinas. El receptor puede ser un receptor de quimiocinas. El receptor puede ser un receptor del factor de crecimiento. El receptor del factor de crecimiento puede ser un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). El EGFR puede ser EGFR1. El EGFR puede ser Her2. El receptor puede ser un receptor de colecistoquinina B. El receptor puede ser un receptor de hormona liberadora de
20 gonadotropina. El receptor puede ser un receptor de somatostatina. El receptor puede ser el receptor 2 de somatostatina. El receptor puede ser un receptor peptídico liberador de gastrina. El receptor puede ser un receptor de neuroquinina. Puede ser el receptor de neuroquinina 1, también conocido como receptor de taquiquinina 1. El receptor puede ser un receptor de melanocortina. El receptor puede ser el receptor de melanocortina 1. El receptor puede ser un receptor de neurotensina. El receptor puede ser un receptor neuropéptido Y. El receptor puede ser una integrina.
25 La integrina puede ser una integrina av. La integrina puede ser la integrina avB3.

[0246] El receptor, correceptor, antígeno o marcador de superficie celular puede comprender un grupo de proteínas de diferenciación. El grupo de proteínas de diferenciación puede seleccionarse de CD 19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD40, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD105, CD138, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, la proteína de
30 diferenciación puede comprender CD38.

[0247] La proteína transmembrana puede comprender una glicoproteína. La glicoproteína puede ser una molécula 1 de tipo lectina tipo C (CLL-1).

35 [0248] El receptor, correceptor, antígeno, proteína transmembrana o marcador celular puede ser una molécula de adhesión celular. La molécula de adhesión celular puede unirse a una célula. La molécula de adhesión celular puede unirse a la matriz extracelular. El receptor, correceptor, antígeno o marcador de superficie celular puede comprender una proteína de unión gap.

40 [0249] Un antígeno puede evocar la producción de uno o más anticuerpos. Un antígeno puede referirse a una molécula o fragmento molecular que puede estar unido por un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y presentado a un receptor de células T. El término "antígeno" también puede referirse a un inmunógeno. Un inmunógeno puede provocar una respuesta inmune adaptativa si se inyecta por sí solo en un sujeto. Un inmunógeno puede inducir una respuesta inmune por sí mismo. Un antígeno también puede referirse a un hapteno. Un hapteno puede ser un agente de
45 focalización. Generalmente, un hapteno puede inducir una respuesta inmune cuando se une a una molécula portadora más grande, tal como una proteína. Los antígenos pueden ser proteínas o polisacáridos. Los antígenos pueden comprender partes (p. ej., capas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas) de bacterias, virus y otros microorganismos. Lípidos y ácidos nucleicos pueden ser antigénicos cuando se combinan con proteínas y polisacáridos. Los antígenos pueden incluir superantígenos, antígenos T-dependientes y antígenos T-independientes.

50 [0250] Los antígenos pueden ser antígenos exógenos o antígenos endógenos. Los antígenos exógenos son típicamente antígenos que han ingresado al cuerpo desde el exterior, por ejemplo, por inhalación, ingestión o inyección. Algunos antígenos pueden comenzar como antígenos exógenos y luego volverse endógenos (p. ej., virus intracelulares). Los antígenos intracelulares pueden liberarse nuevamente a la circulación tras la destrucción de la
55 célula infectada, nuevamente. Los antígenos endógenos pueden ser antígenos que se han generado dentro de células previamente normales como resultado del metabolismo celular normal o debido a una infección bacteriana viral o intracelular.

60 [0251] Los antígenos también pueden incluir autoantígenos. Un autoantígeno puede ser una proteína normal o un complejo de proteínas (y a veces ADN o ARN) que es reconocido por el sistema inmune de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune específica. Estos antígenos no deberían ser, en condiciones normales, la diana del sistema inmune, pero, debido principalmente a factores genéticos y ambientales, la tolerancia inmunológica normal a dicho antígeno se ha perdido en estos pacientes.

65 [0252] Los antígenos pueden incluir antígenos tumorales. Los antígenos o neoantígenos tumorales pueden ser antígenos que son presentados por las moléculas MHC I o MHC II en la superficie de las células tumorales. Estos

antígenos a veces pueden ser presentados por células tumorales y nunca por las normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor (TSA) y, en general, son el resultado de una mutación específica de tumor. Más comunes son los antígenos que presentan las células tumorales y las células normales, y se denominan antígenos asociados a tumores (TAA). Los linfocitos T citotóxicos que reconocen estos antígenos pueden destruir las células tumorales antes de que proliferen o hagan metástasis. Los antígenos tumorales también pueden estar en la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado, en cuyo caso pueden ser reconocidos por las células B.

VIII. Indicaciones

[0253] Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización y las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar una o más enfermedades o afecciones en un sujeto que las necesita. El método puede comprender administrar un conjugado de anticuerpo de agente de focalización a un sujeto que lo necesite. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender (a) una primera región que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie en una primera célula; y (b) una segunda región que comprende una región no anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie en una segunda célula. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-CD3. La región no anticuerpo puede interactuar con un PSMA en la segunda célula. La región no anticuerpo puede comprender DUPA. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además uno o más enlazadores. El uno o más enlazadores pueden conectar la primera región y la segunda región. La una o más enfermedades o afecciones pueden ser un cáncer, una infección patógena, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria o un trastorno genético.

[0254] En algunos casos, la una o más enfermedades comprenden un cáncer. El cáncer puede comprender un cáncer recurrente y/o refractario. Los ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, sarcomas, carcinomas, linfomas o leucemias.

[0255] El cáncer puede comprender un cáncer neuroendocrino. El cáncer puede comprender un cáncer pancreático. El cáncer puede comprender un cáncer pancreático exocrino. El cáncer puede comprender un cáncer de tiroides. El cáncer de tiroides puede comprender un cáncer medular de tiroides.

[0256] El cáncer puede comprender un cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata positivo para PSMA. La expresión de PSMA puede estar altamente regulada y restringida a las células cancerosas en algunas o todas las etapas del cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de próstata resistente a hormonas.

[0257] El cáncer puede comprender un cáncer epitelial. El cáncer puede comprender un cáncer de mama. El cáncer puede comprender un cáncer endometrial. El cáncer puede comprender un cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede comprender un cáncer de ovario estromal. El cáncer puede comprender un cáncer cervical.

[0258] El cáncer puede comprender un cáncer de piel. El cáncer de piel puede comprender un cáncer de piel neovascular. El cáncer de piel puede comprender un melanoma.

[0259] El cáncer puede comprender un cáncer de riñón.

[0260] El cáncer puede comprender un cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón puede comprender un cáncer de pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón puede comprender un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

[0261] El cáncer puede comprender un cáncer colorrectal. El cáncer puede comprender un cáncer gástrico. El cáncer puede comprender un cáncer de colon.

[0262] El cáncer puede comprender un cáncer de cerebro. El cáncer cerebral puede comprender un tumor cerebral. El cáncer puede comprender un glioblastoma. El cáncer puede comprender un astrocitoma.

[0263] El cáncer puede comprender un cáncer de sangre. El cáncer de sangre puede comprender una leucemia. La leucemia puede comprender una leucemia mieloide. El cáncer puede comprender un linfoma. El linfoma puede comprender un linfoma no Hodgkin.

[0264] El cáncer puede comprender un sarcoma. El sarcoma puede comprender un sarcoma de Ewing.

[0265] Los sarcomas son cánceres de hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otro tejido conectivo o de apoyo. Los sarcomas incluyen, entre otros, cáncer óseo, fibrosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, schwannoma vestibular bilateral, osteosarcoma, sarcomas de partes blandas (p. ej., sarcoma de partes blandas alveolar, angiosarcoma, cistosarcoma filoides, dermatofibrosarcoma, tumor desmoides, sarcoma epitelioide, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rhabdomiomasarcoma y sarcoma sinovial).

[0266] Los carcinomas son cánceres que comienzan en las células epiteliales, que son células que cubren la superficie del cuerpo, producen hormonas y forman glándulas. A modo de ejemplo no limitativo, los carcinomas incluyen cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, vaginal cáncer, cáncer vulvar, cáncer uterino, cáncer oral, cáncer de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, cáncer de piel, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del estroma gastrointestinal, adenocarcinoma, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de la región anal, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de la uretra, cáncer de la pelvis renal, cáncer del uréter, cáncer del endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de la glándula pituitaria, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, glioma del tronco encefálico y tumores del eje espinal. En algunos casos, el cáncer es un cáncer de piel, como un carcinoma basocelular, escamoso, melanoma, no melanoma o queratosis actínica (solar).

[0267] En algunos casos, el cáncer es un cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón puede comenzar en las vías respiratorias que se ramifican desde la tráquea para suministrar los pulmones (bronquios) o los pequeños sacos de aire del pulmón (los alvéolos). Los cánceres de pulmón incluyen carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPNM), carcinoma de pulmón de células pequeñas y mesotelioma. Los ejemplos de NSCLC incluyen carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. El mesotelioma puede ser un tumor canceroso del revestimiento del pulmón y la cavidad torácica (pleura) o el revestimiento del abdomen (peritoneo). El mesotelioma puede deberse a la exposición al asbesto. El cáncer puede ser un cáncer cerebral, como un glioblastoma.

[0268] Alternativamente, el cáncer puede ser un tumor del sistema nervioso central (SNC). Los tumores del SNC pueden clasificarse como gliomas o nongliomas. El glioma puede ser glioma maligno, glioma de alto grado, glioma pontino intrínseco difuso. Los ejemplos de gliomas incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas (o mezclas de oligodendroglioma y elementos de astrocitoma) y ependimomas. Los astrocitomas incluyen, entre otros, astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleomórfico y astrocitoma subependimario de células gigantes. Los oligodendrogliomas incluyen oligodendrogliomas de bajo grado (u oligoastrocitomas) y oligodendrogliomas anaplásicos. Los nongliomas incluyen meningiomas, adenomas pituitarios, linfomas primarios del SNC y meduloblastomas. En algunos casos, el cáncer es un meningioma.

[0269] La leucemia puede ser una leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, o leucemia mielocítica crónica. Tipos adicionales de leucemias incluyen leucemia de células pilosas, leucemia mielomonocítica crónica y leucemia mielomonocítica juvenil.

[0270] Los linfomas son cánceres de los linfocitos y pueden desarrollarse a partir de linfocitos B o T. Los dos tipos principales de linfoma son el linfoma de Hodgkin, anteriormente conocido como enfermedad de Hodgkin, y el linfoma no Hodgkin. El linfoma de Hodgkin está marcado por la presencia de la célula de Reed-Sternberg. Los linfomas no Hodgkin son todos linfomas que no son linfomas de Hodgkin. Los linfomas no Hodgkin pueden ser linfomas indolentes y linfomas agresivos. Los linfomas no Hodgkin incluyen, entre otros, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de tejido linfático asociado a la mucosa (MALT), linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de células B grandes, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma nodal de la zona marginal de células B (NMZL), linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL), linfoma extranodal de la zona marginal de células B, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario y granulomatosis linfomatoide.

[0271] La una o más enfermedades o afecciones pueden ser una infección patogénica. Las infecciones patógenas pueden ser causadas por uno o más patógenos. En algunos casos, el patógeno es una bacteria, hongos, virus o protozoos.

[0272] Los ejemplos de patógenos incluyen pero no se limitan a: *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Chlamydomydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio* o *Yersinia*. En algunos casos, la enfermedad o afección causada por el patógeno es la tuberculosis y la muestra heterogénea comprende moléculas extrañas derivadas de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y moléculas derivadas del sujeto. En algunos casos, la enfermedad o afección es causada por una bacteria es la tuberculosis, la neumonía, que puede ser causada por bacterias como *Streptococcus* y *Pseudomonas*, una enfermedad transmitida por los alimentos, que puede ser causada por bacterias como *Shigella*, *Campylobacter* y *Salmonella*, e infección como el tétanos, fiebre tifoidea, difteria, sífilis y lepra. La enfermedad o afección puede ser vaginosis bacteriana, una enfermedad de la vagina causada por un desequilibrio de la flora bacteriana natural. Alternativamente, la enfermedad o afección es una meningitis bacteriana, una inflamación bacteriana de las meninges (p. ej., las membranas protectoras que cubren el cerebro y la médula espinal). Otras enfermedades o afecciones causadas por bacterias incluyen, entre otras, neumonía bacteriana, infección del tracto urinario, gastroenteritis bacteriana e infección bacteriana de la piel. Los ejemplos de infecciones bacterianas de la piel incluyen, pero no se limitan a, impétigo que puede ser causado por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*; erisipela que puede ser causada por una infección bacteriana por estreptococos de la epidermis profunda con diseminación linfática; y celulitis que puede ser causada por la flora normal de la piel o por

bacterias exógenas.

[0273] El patógeno puede ser un hongo, tal como, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* y *Stachybotrys*. Los ejemplos de enfermedades o afecciones causadas por un hongo incluyen, pero no se limitan a, tiña inguinal, infección por levaduras, tiña y pie de atleta.

[0274] El patógeno puede ser un virus. Los ejemplos de virus incluyen, entre otros, adenovirus, virus coxsackie, virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis (p. ej., Hepatitis A, B y C), virus del herpes simple (tipo 1 y 2), citomegalovirus, virus del herpes, VIH, virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma, virus de la parainfluenza, poliovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la rubéola y virus de la varicela-zoster. Los ejemplos de enfermedades o afecciones causadas por virus incluyen, entre otros, resfriado, gripe, hepatitis, SIDA, varicela, rubéola, paperas, sarampión, verrugas y poliomielitis.

[0275] El patógeno puede ser un protozoo, tal como *Acanthamoeba* (p. ej., *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes*, *A. healyi*, *A. divionensis*), *Brachiola* (p. ej., *B. connori*, *B. vesicularum*), *Cryptosporidium* (p. ej., *C. parvum*), *Cyclospora* (p. ej., *C. cayetanensis*), *Encephalitozoon* (p. ej., *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*), *Entamoeba* (p. ej., *E. histolytica*), *Enterocytozoon* (p. ej., *E. bieneusi*), *Giardia* (p. ej., *G. lamblia*), *Isoospora* (p. ej., *I. belli*), *Microsporidium* (p. ej., *M. africanum*, *M. ceylonensis*), *Naegleria* (p. ej., *N. fowleri*), *Nosema* (p. ej., *N. algerae*, *N. ocularum*), *Pleistophora*, *Trachipleistophora* (p. ej., *T. anthropophthera*, *T. hominis*) y *Vittaforma* (p. ej., *V. corneae*).

[0276] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmune o una enfermedad autoinmune relacionada. Un trastorno autoinmune puede ser un mal funcionamiento del sistema inmune del cuerpo que hace que el cuerpo ataque sus propios tejidos. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes y enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido (APS), anemia aplásica autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, enfermedad de Behcet, enfermedad celíaca, Enfermedad de Crohn, dermatomiositis, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, artritis juvenil, diabetes, diabetes juvenil, Kawasaki, Síndrome de Lambert-Eaton, lupus (LES), enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunes tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, psoriasis, artritis psoriásica, Síndrome de Reiter, policondritis recurrente, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, Síndrome de Sjogren, esperma y autoinmunidad testicular, síndrome de persona rígida, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

[0277] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad inflamatoria. Entre los ejemplos de enfermedades inflamatorias se incluyen, entre otros, alveolitis, amiloidosis, angiitis, espondilitis anquilosante, necrosis avascular, enfermedad de Basedow, parálisis de Bell, bursitis, síndrome del túnel carpiano, enfermedad celíaca, colangitis, condromalacia rotuliana, hepatitis crónica activa, fatiga crónica síndrome de Cogan, displasia congénita de cadera, costocondritis, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, tendinitis de De Quervain, artritis asociada a diabetes, hiperostosis esquelética idiopática difusa, lupus discoide, síndrome de Ehlers-Danlos, fiebre mediterránea familiar, fascitis, fibrositis/fibromialgia, hombro congelado, ganglio quistes, arteritis de células gigantes, gota, enfermedad de Graves, síndromes de enfermedad reumática asociada al VIH, artritis asociada a hiperparatiroides, artritis infecciosa, síndrome inflamatorio del intestino/síndrome del intestino irritable, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, síndrome de Marfan, enfermedad de Mikulicz, tejido conectivo mixto enfermedad, esclerosis múltiple, miofasci Síndrome de dolor, osteoartritis, osteomalacia, osteoporosis y osteoporosis inducida por corticosteroides, enfermedad de Paget, reumatismo palindrómico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Plummer, polimialgia reumática, polimiositis, seudogota, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome reumático, artritis reuma, síndrome reumático, artritis reumática, sarcoidosis, ciática (radiculopatía lumbar), esclerodermia, escorbuto, artritis drepanocítica, síndrome de Sjogren, síndrome de Sjogren, estenosis espinal, espondiloistisis, enfermedad de Still, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Takayasu (sin pulso), tendinitis, codo de tenista/artritis asociada al golf, artritis asociada al tiroides, dedo en gatillo, colitis ulcerosa, granulomatosis de Wegener y enfermedad de Whipple.

[0278] Se describen adicionalmente en el presente documento usos del conjugado de anticuerpo del agente de focalización descrito en el presente documento para tratar una enfermedad o afección. En el presente documento se describe el uso de un conjugado de anticuerpo del agente de focalización para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, en donde el conjugado de anticuerpo del agente de focalización comprende (a) una primera región que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que interactúa con una célula inmune; y (b) una segunda región que comprende una porción no anticuerpo que interactúa con una célula diana. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender además uno o más enlazadores. El uno o más enlazadores pueden conectar la primera región y la segunda región del conjugado de anticuerpo del agente de focalización. La porción no anticuerpo puede interactuar con PSMA en la célula diana. La porción no anticuerpo puede comprender DUPA. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-CD3. El cáncer puede ser un cáncer de próstata.

IX. Modulación inmune

[0279] Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización descritos en este documento pueden usarse para modular una respuesta inmune. La modulación de una respuesta inmune puede comprender la estimulación, activación, aumento, mejora, o regulación por una respuesta inmune. La modulación de una respuesta inmune puede comprender suprimir, inhibir, prevenir, reducir o regular negativamente una respuesta inmune. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede unirse a una primera célula y un agente de focalización que puede unirse a una segunda célula. La unión del anticuerpo a la primera y segunda célula puede dar como resultado la modulación de una respuesta inmune. La primera célula puede ser una célula inmune. La célula inmune puede ser una célula hematopoyética. La segunda célula puede ser una célula inmune, una célula sana, una célula cancerosa, una bacteria o infectada por virus.

[0280] Los métodos de modulación de una respuesta inmune pueden comprender (a) poner en contacto una célula inmune con un conjugado de anticuerpo del agente de focalización para producir un complejo conjugado de anticuerpo del agente de focalización de la célula inmune; y (b) poner en contacto una célula diana con el complejo conjugado de anticuerpos del agente de focalización de células inmunes, modulando así una respuesta inmune de la célula inmunitaria.

[0281] Alternativamente, el método puede comprender (a) poner en contacto una célula diana con un conjugado de anticuerpo del agente diana para producir un complejo conjugado de anticuerpo del agente diana de la célula diana; y (b) poner en contacto una célula inmune con el complejo conjugado de anticuerpo del agente de focalización de la célula diana, modulando así una respuesta inmune de la célula inmune. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un anticuerpo o fragmento del mismo que interactúa con un marcador de superficie celular en la célula inmune. El marcador de la superficie celular en el sistema inmune puede ser un receptor o correceptor. El marcador de la superficie celular puede ser un correceptor de células T CD3. El marcador de la superficie celular en la célula inmune puede ser una proteína, glicoproteína o esteroide. La célula inmune puede ser una célula T. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender una porción sin anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie celular en una célula diana. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede conectar la célula inmune a la célula diana. La célula diana puede ser una célula cancerosa. La célula diana puede ser una célula infectada por virus. La célula diana puede ser una célula inmune. La célula inmune puede ser una célula T. La célula inmune puede ser un macrófago. La célula inmune puede ser una célula B. El marcador de superficie celular en la célula diana puede ser un receptor, correceptor, proteína de superficie, glicoproteína o esteroide. La porción no anticuerpo del conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender un ligando, citocina, toxina o molécula pequeña. Los métodos para modular la respuesta inmune pueden comprender además administrar uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicionales al sujeto. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden interactuar con una o más células inmunes adicionales. La una o más células inmunes adicionales pueden ser el mismo tipo de célula inmunitaria que la célula inmunitaria anterior. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización también puede interactuar con una célula T. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células inmunes adicionales pueden ser un tipo diferente de célula inmunitaria que la célula inmunitaria previa. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula presentadora de antígeno y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden interactuar con una o más células adicionales. La una o más células adicionales pueden ser del mismo tipo celular que la célula inmune o la célula diana. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células adicionales pueden ser diferentes de la célula inmune o la célula diana. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula bacteriana y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus.

[0282] En otra alternativa, el método puede comprender (a) poner en contacto una muestra que comprende una célula diana y una célula inmunitaria con un conjugado de anticuerpo de agente de focalización; y (b) conectar la célula diana y la célula inmune a través del conjugado de anticuerpo del agente de focalización, modulando así una respuesta inmune de la célula inmune. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender un anticuerpo o fragmento del mismo que interactúa con un marcador de superficie celular en la célula inmune. El marcador de la superficie celular en el sistema inmune puede ser un receptor o correceptor. El marcador de la superficie celular puede ser un correceptor de células T CD3. El marcador de la superficie celular en la célula inmune puede ser una proteína, glicoproteína o esteroide. La célula inmune puede ser una célula T. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender una porción sin anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie celular en una célula diana. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede conectar la célula inmune a la célula diana. La célula diana puede ser una célula cancerosa. La célula diana puede ser una célula infectada por virus. La célula diana puede ser una célula inmune. La célula inmune puede ser una célula T. La célula inmune puede ser un macrófago. La célula inmune puede ser una célula B. El marcador de superficie celular en la célula diana puede ser un receptor, correceptor, proteína de superficie, glicoproteína o esteroide. La porción no anticuerpo del conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender un ligando, citocina, toxina o molécula pequeña. Los métodos para modular la respuesta inmune pueden comprender además administrar uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicionales al sujeto. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden

interactuar con una o más células inmunes adicionales. La una o más células inmunes adicionales pueden ser el mismo tipo de célula inmunitaria que la célula inmunitaria anterior. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización también puede interactuar con una célula T. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células inmunes adicionales pueden ser un tipo diferente de célula inmunitaria que la célula inmunitaria previa. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula presentadora de antígeno y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden interactuar con una o más células adicionales. La una o más células adicionales pueden ser del mismo tipo celular que la célula inmune o la célula diana. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células adicionales pueden ser diferentes de la célula o células diana inmunitarias. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula bacteriana y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus.

[0283] Los métodos para modular una respuesta inmune pueden comprender administrar una composición que comprende un conjugado de anticuerpo del agente de focalización a un sujeto que lo necesita, en donde el conjugado de anticuerpo del agente de focalización comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie celular en una célula inmune. El marcador de la superficie celular en el sistema inmune puede ser un receptor o correceptor. El marcador de la superficie celular puede ser un correceptor de células T CD3. El marcador de la superficie celular en la célula inmune puede ser una proteína, glucoproteína o esteroide. La célula inmune puede ser una célula T. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede comprender una porción sin anticuerpo que interactúa con un marcador de superficie celular en una segunda célula. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede conectar la célula inmune a la segunda célula. La segunda célula puede ser una célula cancerosa. La segunda célula puede ser una célula infectada por virus. La segunda célula puede ser una célula inmune. La célula inmune puede ser una célula T. La célula inmune puede ser un macrófago. La célula inmune puede ser una célula B. El marcador de superficie celular en la segunda célula puede ser un receptor, correceptor, proteína de superficie, glicoproteína o esteroide. La porción no anticuerpo del conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender un ligando, citocina, toxina o molécula pequeña. Los métodos para modular la respuesta inmune pueden comprender además administrar uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicionales al sujeto. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden interactuar con una o más células inmunes adicionales. La una o más células inmunes adicionales pueden ser el mismo tipo de célula inmunitaria que la célula inmunitaria anterior. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización también puede interactuar con una célula T. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células inmunes adicionales pueden ser un tipo diferente de célula inmunitaria que la célula inmunitaria previa. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula presentadora de antígeno y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula T. El uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional pueden interactuar con una o más células adicionales. La una o más células adicionales pueden ser del mismo tipo celular que la célula inmune o la segunda célula. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus y un segundo conjugado de anticuerpo de agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus. Alternativamente, o adicionalmente, la una o más células adicionales pueden ser diferentes de la célula inmune o la segunda célula. Por ejemplo, un primer conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula bacteriana y un segundo conjugado de anticuerpo del agente de focalización puede interactuar con una célula infectada por virus.

X. Aplicaciones adicionales

[0284] Se describen adicionalmente en el presente documento métodos para conectar dos o más células. El método puede comprender poner en contacto una muestra que comprende dos o más células con un agente conjugado de anticuerpo dirigido. El agente conjugado de anticuerpo dirigido puede comprender (a) una primera región que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y (b) una segunda región que comprende una porción no anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede interactuar con un marcador de superficie en una primera célula. La porción no anticuerpo puede interactuar con un marcador de superficie en una segunda célula. La primera y la segunda célula pueden ser del mismo tipo de célula. Las células primera y segunda pueden ser diferentes tipos de células. Los marcadores de superficie pueden ser un receptor, correceptor, proteína, glucoproteína, antígeno, polisacárido o esteroide. El método puede comprender además poner en contacto la muestra con uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicionales. El uno o más conjugados de anticuerpo del agente de focalización adicional pueden comprender (a) una primera región que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y (b) una segunda región que comprende una porción no anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional puede interactuar con un marcador de superficie en la primera célula, la segunda célula o una tercera célula. La porción no anticuerpo del uno o más conjugados de anticuerpos del agente de focalización adicional puede interactuar con un marcador de superficie en la primera célula, la segunda célula o una cuarta célula. Las células primera, segunda, tercera y/o cuarta pueden ser del mismo tipo de célula. Las células primera, segunda, tercera y/o cuarta pueden ser tipos de células diferentes.

[0285] Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización pueden usarse para conectar múltiples células. Como tal, los complejos multicelulares pueden formarse mediante la unión de los conjugados de anticuerpos del agente de focalización a las células. Los andamios celulares y/o las matrices celulares pueden formarse mediante la unión de los conjugados de anticuerpos del agente de focalización a las células.

[0286] La primera región y la segunda región de los conjugados de anticuerpos del agente de focalización pueden estar conectadas por uno o más enlazadores. Los enlazadores pueden ser biodegradables. Los enlazadores pueden ser escindibles. Como tal, pueden formarse complejos temporales de célula-célula, armazones o matrices usando conjugados de anticuerpos del agente de focalización que comprenden enlazadores biodegradables, escindibles o degradables de otro modo para conectar dos o más células. Alternativamente, o adicionalmente, los enlazadores pueden ser resistentes a la escisión o degradación. Como tal, se pueden formar complejos célula-célula permanentes o semipermanentes, andamios o matrices usando conjugados de anticuerpo de agente de focalización que comprenden enlazadores resistentes a la degradación o escisión para conectar dos o más células. Los conjugados de anticuerpos del agente de focalización pueden comprender una mezcla de enlazadores degradables y no degradables para crear complejos célula-célula flexibles.

[0287] El uso de los conjugados de anticuerpos del agente de focalización puede permitir el análisis de interacciones célula-célula y rutas de transducción de señales. Las células pueden aislarse adicionalmente y puede realizarse un perfil de expresión de las células. Este tipo de análisis puede usarse en el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesite.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1: Análisis de citometría de flujo: unión DUPA-Phthal-doble-αCD3 a células C4-2

[0288] En este ejemplo, conjugamos dos ligandos DUPA con un Fab anti-CD3 de modo que el ligando bivalente pueda unirse simultáneamente a cada subunidad del homodímero PSMA con gran avidéz. Para sintetizar un Fab bivalente, introdujimos codones TAG en dos posiciones diferentes (cadena ligera S202 y cadena pesada K138), y el doble mutante se expresó y purificó como se describió anteriormente. En particular, los niveles de expresión fueron comparables con otros mutantes individuales y el anticuerpo de tipo silvestre que se expresaron previamente. El anticuerpo doble mutante se conjugó con P-Phthal (3) o P-DNP (4) como se describió anteriormente; El análisis de LC-MS reveló que la reacción se completó (>95% de eficiencia) en 48 horas, produciendo los conjugados bivalentes, P-Phthal-doble-αCD3 (12) y P-DNP-doble-αCD3 (13). Después de la purificación, las estructuras se confirmaron mediante SDS-PAGE y LC-MS (los rendimientos de reacción después de las purificaciones son >90%). Luego se evaluó la unión de los conjugados bivalentes a las células C4-2 (junto con los conjugados monovalentes) utilizando citometría de flujo (Figura 9, Tabla 1). Se observó una mejora significativa en la afinidad de unión (>60 veces) para el P-Phthal-doble-αCD3 bivalente (12) en comparación con el P-Phthal-HK138-αCD3 monovalente (7). Curiosamente, P-DNP-doble-αCD3 (13) no mostró una mejora significativa sobre su equivalente monovalente P-DNP-HK138-αCD3 (8), que ya tenía una alta afinidad. La afinidad de unión mejorada de P-Phthal-doble-αCD3 (12) fue particularmente alentadora porque a pesar de la alta afinidad del grupo DNP, su elevada inmunogenicidad conocida podría limitar su uso *in vivo*.

Tabla 1. Análisis FACS de la unión de diferentes conjugados de P-anti-CD3 a células C4-2 positivas para PSMA a diversas concentraciones.

[M]	Porcentaje positivo						
	P-Phthal-LC- 109	P-Phthal-LC- 202	P-Phthal-HC- 123	P-Phthal-HC- 138	P DNP HC	P-Pthal doble	P-DNP doble
0,000001	100	99,9	93,2	99	99,9	99,8	99,6
2E-07	99,4	99,8	92,8	97,5	100	98	98,7
4E-08	95,2	95,6	69,7	89,5	99,5	96,2	97,7
8E-09	56,7	42,5	7,6	32,4	99	95,1	97,5
1,6E-09	1,94	1,37	0,42	0,82	93,7	91	96,9
3,2E-10	0,49	0,47	0,76	0,079	38,2	60	86,3
6,4E-11	0,88	0,38	0,29	0,08	1,44	5,46	27,1
1,28E-11	0	0,66	0,52	0,43	0,13	0,4	0,81

Ejemplo de referencia 2: Citotoxicidad in vitro de conjugados DUPA/anti-CD3

[0289] A continuación comparamos la citotoxicidad *in vitro* de diversos conjugados DUPA/αCD3. Las células mononucleares de sangre periférica humana recién purificadas (hPBMC) se mezclaron con células C4-2 (PSMA+) en una proporción de 10:1 (100.000 y 10.000 células, respectivamente), y se incubaron con cada conjugado durante 24 horas. Se usó una mezcla 1:1 de Fab UCHT1 de tipo silvestre y el conjugado de enlazador DUPA (P-DNP, 4) como control negativo. La citotoxicidad se determinó midiendo la lactosa deshidrogenasa (LDH) liberada de las células diana lisadas. Como se muestra en la FIG. 10 y la Tabla 2, cada uno de los conjugados, con la excepción de P-Phthal-HC-

123- α CD3 (11) que se unió mal a las células C4-2 en el ensayo anterior, mostró citotoxicidad dependiente de la dosis. P-Phthal-LC-109- α CD3 (9) mostró una citotoxicidad reducida ($CE_{50} \sim 4,1$ nM) en comparación con P-Phthal-LC-202- α CD3 (10, $CE_{50} \sim 0,4$ nM) y P-Phthal-HC -138- α CD3 (7, $CE_{50} \sim 0,5$ nM), aunque todos tenían afinidades similares en los estudios de unión. Finalmente, P-Phthal-doble α -CD3 (12) mostró la citotoxicidad más alta ($CE_{50} \sim 0,1$ nM) en comparación con las construcciones monovalentes. No se observó citotoxicidad incluso a la concentración más alta medida con el enlazador de DUPA no conjugado y las mezclas Fab UCHT1. Tomados en conjunto, estos resultados indican que no solo la afinidad sino también la geometría del biespecífico afecta significativamente la citotoxicidad. Con base en los ensayos de citotoxicidad de unión *in vitro*, elegimos el conjugado P-Phthal-doble- α CD3 (12) (también conocido como conjugado de anticuerpo de molécula pequeña dirigido a PSMA, conjugado de anticuerpo del agente de focalización a P) para caracterización adicional.

Tabla 2. Citotoxicidad *in vitro* de células diana

[pm]	Porcentaje de citotoxicidad								
	T109			S202			A123		
0	-6,31405	-1,15703	8,561983	-3,33884	0,628099	1,619835	-1,91715	4,861349	3,218076
1,28	-5,52066	2,016529	3,801653	-2,34711	2,809917	-1,95041	-2,12256	3,834303	4,450531
6,4	-6,5124	7,570248	7,966942	-2,94215	3,206612	4,198347	-0,27388	0,342349	2,191031
32	-4,92562	6,578512	6,380165	-2,94215	4,198347	3,404959	0,342349	3,012667	6,710031
160	2,214876	9,752066	11,73554	10,54545	25,61983	17,8843	-3,97124	-5,40911	5,272167
800	16,29752	35,33884	30,97521	52	63,70248	56,95868	-3,97124	-0,06847	6,710031
4000	35,73554	47,83471	48,6281	64,29752	75,80165	76,3967	5,272167	4,450531	11,84526
20000	51,20661	65,09091	75,20661	72,42975	83,1405	77,58678	8,764122	5,477576	15,54262
100000	66,47934	76,19835	83,33884	83,1405	83,73553	82,54546	9,996576	5,272167	16,15885
[pm]	K138			phthal doble			inconj		
0	-3,14961	-2,9442	-0,06847	-5,89878	7,504363	3,73473	0	0	0
1,28	-1,71174	-0,06847	1,163985	2,268761	5,410122	3,73473	0	0,230681	0,230947
6,4	-2,53338	1,369394	12,05067	-1,08202	3,525306	4,991274	-0,92593	-0,46136	-0,57737
32	-2,12256	1,780212	4,245121	6,876091	11,90227	10,85515	-0,61728	-0,69204	-1,61663
160	16,15885	12,05067	14,31017	42,26876	49,5986	54,83421	-1,64609	-0,92272	-1,15473
800	51,0784	56,82985	62,58131	59,86038	70,12216	85,41013	0,514403	1,845444	0,577367
4000	78,1924	77,16535	74,70045	69,49389	78,49913	77,452	4,526749	3,921569	3,117783
20000	70,59226	82,30058	76,13831	66,56196	75,56719	78,70855	2,777778	3,921569	4,157044
100000	84,9709	85,99795	101,1982	74,52007	82,68761	71,37871	2,469136	5,536332	3,00231

[0290] Finalmente, la morfología de roseta que es evidente tras la formación de sinapsis se observó claramente solo en presencia del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P con células C4-2 (Figura 11).

Ejemplo 3: PK *in vivo* y actividad antitumoral

[0291] Primero evaluamos la farmacocinética del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P. Se inyectaron ratas macho Sprague Dawley (Charles River) por vía intravenosa en el tiempo cero a 1 y 5 mg/kg para el conjugado de anticuerpo del agente de focalización P o 0,5 mg/kg para el Fab UCHT1 no conjugado. Se recogió sangre a intervalos regulares hasta 32 horas y se procesó para medir las concentraciones de fármaco utilizando un ELISA en sándwich. Curiosamente, el conjugado de anticuerpos del agente de focalización P mostró una vida media circulante significativamente mejorada (~ 5-6 horas) en comparación con el Fab no conjugado (~ 1 hora) tal vez debido a la mayor hidrofobicidad general del resto enlazador DUPA después de la conjugación. De nota, el conjugado de anticuerpo de agente de focalización P tiene una vida media en suero mejorada con respecto a los scFv pequeños biespecíficos tales como BiTEs (Bispecific T cell Engager, ~ 2 horas y vida media en humano) a pesar de su peso molecular similar (~ 50.000 Da). La semivida en suero mejorada del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P se traduce en una vida media en humanos de dosis $\geq 1x/día$. Además, el pequeño tamaño del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P puede ser ventajoso para penetrar tumores sólidos.

[0292] A continuación, establecimos un modelo de xenoinjerto de ratón para evaluar la eficacia *in vivo* del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P. Los ratones inmunodeficientes NOD/SCID se inyectaron por vía subcutánea con una mezcla de 1×10^6 células C4-2 y 2×10^6 hPBMCs en matrigel (BD Bioscience). Después de 4 días, se inició el tratamiento inyectando 2 mg/kg de fármaco a través de la vena de la cola y continuó durante 10 días (n = 6). En un grupo de control, los ratones fueron inyectados con una mezcla no conjugada de PPhthal (3) y Fab UCHT1 de tipo silvestre, y otro grupo de ratones fue inyectado con vehículo solo (n = 6). El crecimiento del tumor se

controló mediante medición de calibre externo. La mezcla y el grupo vehículo mostraron crecimiento tumoral aproximadamente dos semanas después de la implantación. Sin embargo, el grupo de tratamiento no desarrolló ningún tumor palpable durante hasta 6 semanas (cuando todos los ratones en los otros dos grupos tuvieron que ser sacrificados debido a los grandes tamaños de los tumores (Figura 12, Tabla 3). La histología también confirmó la formación de tumores sólidos en ratones a partir de los grupos de control (PBS y grupo de mezcla) mientras que no se detectaron tumores sólidos en el grupo de tratamiento. Después de confirmar la eficacia profiláctica del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P, llevamos un modelo de xenoinjerto en donde retrasamos el tratamiento hasta que observamos la formación de un tumor palpable. En este estudio de tratamiento, utilizamos ratones NOD/scid gamma (NSG, Jackson Laboratory), que se sabe que son más adecuados para la reconstitución inmune con células derivadas de humanos. En el día cero, se inyectaron por vía subcutánea 1×10^6 células C4-2 en matrigel y, después de tres días, se inyectaron por separado 20×10^6 hPBMC en la cavidad peritoneal. Esta inyección separada de hPBMC permite además evaluar la capacidad del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P para redirigir las células T desde la periferia al sitio del tumor. Se formaron tumores sólidos palpables ($\sim 150 \text{ mm}^3$) en ratones aproximadamente dos semanas después de la implantación del tumor, momento en donde comenzamos el tratamiento mediante inyección en la vena de la cola con 1 mg/kg de conjugado de anticuerpo con agente de focalización P durante 10 días ($n = 7$). En el primer y cuarto día de tratamiento, coinyectamos 10×10^6 de células T expandidas *ex vivo* del mismo donante a través de la vena de la cola en todos los grupos para complementar más células efectoras citotóxicas. Después de que se inició el tratamiento, se observó contracción tumoral inmediata en el grupo de tratamiento, mientras que el grupo vehículo ($n = 7$) mostró nuevamente un rápido crecimiento del tumor.

Tabla 3. Estudios de eficacia *in vivo* del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P

		Volumen tumoral [mm^3]					
Día		Conjugado de anticuerpo del agente de focalización P					
2	37.888	113,4	61,32	48,618	46,08	52,022	
4	35,77	37,23	35,52	37,765	31,098	36,72	
7	31,968	21,78	44,376	60,04	43,2	43,8	
11	29,127	42,282	43,092	74,646	29,07	37,422	
14	27,269	27,72	25,2405	38,766	29,106	29,106	
18	13,8355	36,686	20,8035	27,255	28,44	28,116	
21	18,63	22,62	0	19,7945	0	20,475	
25	18,009	26,18	23,79	22,32	11,088	10,962	
28	14,413	40,95	21,168	37,026	28,49	39,368	
32	45,2965	74,493	0	24,36	28,86	14,64	
36	36,6825	96,148	34,02	22,01	0	16,896	
42	23,94	74,8	30,016	41,616	0	16,775	
Día		Mezcla no conjugada					
2	46,512	52,65	65,934	51,714	51,205	67,068	
4	37,185	26,88	36,96	39,347	38,08	37,488	
7	35,644	44,968	40,32	39,9	45,54	43,2	
11	54,32	37,422	54	43,12	44,968	34,125	
14	41,208	30,66	51,264	49,217	55,48	34,684	
18	36,92	44,156	227,476	203,463	250,908	58,32	
21	44,625	25,3125	601,965	563,64	494,125	26,04	
25	169,32	38,25	686,28	944,58	532,35	44,064	
28	180,5	63,882	757,68	1387,2	513,188	131,648	
32	360,47	73,44			697,6375	393,12	
36	356,16	91,047			1130,96	766,233	
42	519,294	57,646					
Día		PBS					
2	40,052	49,928	36,4	45,369	58,8	44,384	
4	37,8	25,62	39,69	34,6385	62,123	25,56	
7	32,319	36,652	33,744	43,911	67,716	51,128	
11	27,702	39,36	40,664	63,121	54,614	57,4275	
14	35,6655	35,438	18,4	41,7075	37,296	30,03	

(Continuación)

	Día	PBS					
5	18	143,64	156,8	54,648	92,4	104,4	37,31
	21	379,008	157,32	375,417	597,1875	297,54	54,1875
	25	427,68	121,968	701,22	702,1	810,16	48,048
	28	842,996	209,088	1163,986	1098,2	963,746	48,96
	32		493,476				92,4
10	36		921,6				157,32
	42						253,376

Ejemplo 4: Síntesis de compuestos de enlace P de segunda generación

15 **[0293]** En este ejemplo, hemos diseñado y sintetizado un compuesto de enlace P de segunda generación, que mostró una actividad significativamente mejorada en comparación con los enlaces P de primera generación en el ensayo de inhibición de la enzima PSMA. La eficacia *in vitro* e *in vivo* y la PK del compuesto enlazador P de segunda generación se evalúa como se ha descrito anteriormente.

20 **[0294]** Un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata ortotópico en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID gamma) nos permite controlar la migración y penetración de células T humanas transferidas de forma adoptiva en tumores en la glándula prostática. También se utiliza un modelo de cáncer de próstata isoinjerto en ratones inmunocompetentes para examinar más a fondo la actividad *in vivo* y la seguridad del conjugado de anticuerpo del agente de focalización. Para ese propósito, se usa una línea celular de cáncer de próstata de ratón, RM-1-hPSMA, que es singénica en ratones B6. Para reclutar células T de ratón, un Fab α CD3 específico de ratón (2C11) se conjuga con enlazadores P como se describe anteriormente. Es importante destacar que mPSMA se une fuertemente a DUPA (el inhibidor enzimático original de los enlazadores P) que permite la evaluación de la eficacia y la seguridad en ratones. La farmacocinética y la seguridad del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P se evalúa en un modelo no humano de primates, macaco de cynomolgus (*cyno*). En informes anteriores, la actividad glutamato carboxipeptidasa de cynoPSMA fue inhibida eficazmente por inhibidores análogos de sustrato (como DUPA) y, por lo tanto, debería tener una alta afinidad con nuestro enlazador DUPA. Se prepara un conjugado de anticuerpo de agente de focalización reactivo cruzado mono/humano cynomolgus mediante la conjugación del enlazador DUPA a un Fab α CD3 reactivo cruzado humano/cynomolgus de alta afinidad (SP34). El objetivo de estos estudios es proporcionar la información necesaria para guiar un estudio de Fase I que aumenta la dosis en humanos.

35 *Ejemplo 5: Estudio completo de la relación estructura-actividad para determinar el candidato conjugado de anticuerpo del agente de focalización óptimo.*

40 **[0295]** Hemos encontrado que la afinidad de los compuestos de enlace P afecta significativamente la unión a la célula diana de los conjugados de anticuerpo del agente de focalización resultante, que a su vez afectan su actividad citotóxica en ensayos basados en células. Para mejorar aún más la afinidad de enlazador P, reexaminamos los datos previos de la relación estructura-actividad (SAR) y las estructuras cocrystalinas de los complejos inhibidores de PSMA. Con base en el análisis, diseñamos un candidato de enlazador P de segunda generación, P-TriA (FIG. 15J Compuesto 14), en donde el grupo amida C-9 en P-Phthal se sustituye con un enlace triazol y un hidrocarburo lineal más corto el enlazador se usó para conectar dos grupos aromáticos hidrófobos, grupos triazol y ftalimida (FIG. 13).

Ensayo de inhibición de PSMA

50 **[0296]** Una solución 10 mM de *N*-acetilo-aspartilo-glutamato (NAAG) en NaOH 40 mM se diluyó a 40 μ M en tampón de reacción (Tris-HCl 0,1 M, pH = 7,5), y la solución fue agregada a una placa de 384 pocillos (10 μ L por pocillo). Para K_M mediciones y K_M controles negativos (ausencia de PSMA), la solución NAAG se diluyó en serie 2 veces para obtener concentraciones finales de NAAG 40 μ L - 312,5 nM. Para mediciones CI_{50} , los inhibidores de PSMA de agente de focalización en tampón de reacción que contienen solución de NAAG de 40 μ M se diluyó en serie 5 veces para obtener concentraciones finales de inhibidor que van de 100 μ L - 51,2 pM. Para iniciar las reacciones, se añadieron a cada pocillo 10 μ L de rhPSMA (20 μ M en tampón de reacción, investigación de I + D). Tampón de reacción (10 μ L) se añadió a la serie de control K_M . La placa se incubó a 37°C durante 30 min, y luego se calentó a 95°C durante 3 min. Los niveles de ácido glutámico se cuantificaron usando el kit de ensayo de ácido glutámico rojo/glutamato oxidasa Amplex® (Invitrogen). Las intensidades de fluorescencia se midieron usando un lector de microplacas SpectraMax Gemini EM (GMI) con filtros de excitación y emisión de 545 y 590 nm, respectivamente. Los valores de K_i se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff a partir de los valores CI_{50} y K_M y estos valores se calcularon usando el software GraphPad Prism. El valor de K_M (0,288 μ M) es consistente con el reportado en la literatura (Humblet, V.; Misra, P.; Bhushan, KR; Nasr, K.; Ko, Y.-S.; Tsukamoto, T.; Pannier, N.; Frangioni, JV; Maison, WJ Med. Chem. 2009, 52, 544-550). Todos los datos informados representan la media de los experimentos por triplicado.

65 **[0297]** La FIG. 16A y la Tabla 4 representan una curva de inhibición de PSMA representativa por diferentes inhibidores (P-Pthal, P-DNP y P-TriA). El inhibidor de PSMA conocido PMPA se usó como control para el experimento.

Tabla 4. Ensayo de inhibición de PSMA

	Unidades de fluorescencia relativa			
[μ M]	Phthal	DNP	TriA	PMPA
50	581,035	525,6755	559,8246667	549,6583333
10	688,1815	581,8336667	599,969	567,78
2	798,8586667	586,843	562,8576667	599,2116667
0,4	1021,402333	622,7463333	586,721	651,3216667
0,08	1273,804667	704,2426667	664,949	787,839
0,016	1387,603	896,7893333	817,1303333	1118,747667
0,0032	1542,606	1123,0625	950,487	1386,251333
0,00064	1633,913	1413,9875	1259,409667	1575,243667
0,000128	1592,5445	1558,430667	1499,6145	1633,926333
0,0000256	1608,653333	1650,519	1618,877333	1622,5365

[0298] La FIG. 16B y la Tabla 5 representan la curva de Km obtenida del mismo experimento descrito en la Fig. 16A y la Tabla 4.

Tabla 5. Medición de K_M

NAAG [μ M]	RFU
20	653,474
10	549,5883333
5	480,622
2,5	446,9936667
1,25	434,8145
0,625	422,2223333
0,3125	400,6455
0,15625	403,0393333

[0299] Como se muestra en la Tabla 6, el ensayo de inhibición basado en enzimas reveló una afinidad mejorada de más de 400 veces por el P-TriA (promedio $K_i = 4,8 \text{ pM}$) comparado con P-Phthal (promedio $K_i = 2 \text{ nM}$).

Tabla 6.

Ensayo	Phthal CI_{50} (Ki)	DNP CI_{50} (Ki)	TriA CI_{50} (Ki)	PMPA CI_{50} (Ki)	K_m
1	$2,08 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($2,95 \times 10^{-9} \text{ M}$)	$7,28 \times 10^{-9} \text{ M}$ (2,95 $\times 10^{-10} \text{ M}$)	$1,62 \times 10^{-10} \text{ M}$ ($2,30 \times 10^{-12} \text{ M}$)	$1,11 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($1,58 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$2,88 \times 10^{-7} \text{ M}$
2	$3,97 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($2,15 \times 10^{-9} \text{ M}$)	$4,46 \times 10^{-9} \text{ M}$ (2,42 $\times 10^{-11} \text{ M}$)	$1,09 \times 10^{-9} \text{ M}$ (5,91 $\times 10^{-12} \text{ M}$)	$2,48 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($1,34 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$1,09 \times 10^{-7} \text{ M}$
3	$2,23 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($8,39 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$4,58 \times 10^{-9} \text{ M}$ (1,72 $\times 10^{-11} \text{ M}$)	$1,63 \times 10^{-9} \text{ M}$ (6,13 $\times 10^{-12} \text{ M}$)	$1,66 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($6,24 \times 10^{-11} \text{ M}$)	$7,55 \times 10^{-7} \text{ m}$
Promedio K_i	$1,98 \times 10^{-9} \text{ m}$	$4,82 \times 10^{-11} \text{ M}$	$4,78 \times 10^{-12} \text{ M}$	$1,18 \times 10^{-10} \text{ M}$	

Ensayos de citotoxicidad in vitro

[0300] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purificaron de sangre fresca de donantes humanos sanos mediante centrifugación convencional con gradiente de Ficoll-Hypaque. Las PBMC purificadas se lavaron y se incubaron en matraces en medio RPMI con FBS al 10% durante 1 hora para eliminar las células adherentes. Las células C4-2 (PSMA+) (células diana) se disociaron con solución de trypsin/EDTA al 0,05% (HyClone) y se lavaron con RPMI con FBS al 10%. Se mezclaron 1×10^4 células diana con PBMC a una proporción de 1:10 en 100 ml, y se incubaron con diferentes concentraciones de Fabs conjugados y no conjugados (10 ml en PBS) durante 24 y 48 horas a 37°C. La citotoxicidad de cada pocillo se midió para los niveles de LDH (lactato deshidrogenasa) en el sobrenadante usando el kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo Cytotox-96 (Promega). Se añadió solución de lisis (10 ml, proporcionada en el mismo kit) a los pocillos con solo células diana para obtener la destrucción máxima, y se midió la eliminación espontánea de los pocillos con células efectoras y objetivo tratadas con vehículo (10 ml de PBS). La absorbancia a 490 nm se registró utilizando el lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices Corp.). El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = (\text{Absorbancia}_{\text{expt}} - \text{Absorbancia}_{\text{medio espontáneo}}) / (\text{Absorbancia}_{\text{medio de eliminación máximo}} - \text{Absorbancia}_{\text{medio espontáneo}}) \times 100$$

[0301] La FIG. 17A-B muestra la citotoxicidad a las 24 y 48 horas, respectivamente. La Tabla 7 muestra los valores numéricos de los gráficos representados en la FIG. 17A-B.

5

Tabla 7. Ensayo de citotoxicidad in vitro

10

15

20

25

30

% de citotoxicidad			
24 h			
[pm]	conjugado de doble phthal	conjugado doble TriA	wt-UCHT1
0	0	0	0
0,0512	-0,892388451	-1,319308255	-0,175284838
0,256	-0,699912511	-1,604564093	-0,876424189
1,28	-0,699912511	-1,497593154	-0,911481157
6,4	-0,31496063	2,31770369	-0,473269062
32	-0,472440945	13,06828312	-0,753724803
160	11,65354331	33,17881975	-0,403155127
800	31,14610674	36,14726333	1,191936897
4000	33,14085739	37,93902656	1,858019281
48h			
[pm]	conjugado de doble phthal	conjugado doble TriA	wt-UCHT1
0	0	0	0
0,01024	-1,277711965	-1,636828645	-0,608963949
0,0512	-0,913860213	-1,227621483	-1,023059435
0,256	-1,827720426	-1,585677749	-0,519649237
1,28	-1,523100355	4,228473998	-0,081195193
6,4	1,455407006	13,04347826	-0,487171159
32	16,68641056	37,92838875	-1,104254628
160	38,26366559	42,01193521	-0,941864242
800	38,09443222	38,72122762	4,871711595

35

40

45

50

55

[0302] En otro experimento, P-TriA se conjuga con Fab α CD para generar un conjugado de anticuerpo de agente de focalización de P de segunda generación. La actividad *in vitro* y la PK *in vivo* y la eficacia del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P de segunda generación se comparan con el conjugado de anticuerpos del agente de focalización P de primera generación. La eficacia *in vitro* del conjugado de anticuerpo de agente de focalización usando otras líneas celulares de cáncer de próstata PSMA-positivas humanas incluyendo 22Rv1 y PC-3-huPSMA también se evalúa. Además, la actividad del conjugado de anticuerpos del agente de focalización también se prueba en tejido de cáncer de próstata derivado del paciente. También se puede confirmar la especificidad de tejido publicada del resto enlazador P usando un conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) correspondiente y un microarray de tejido congelado (Asterand). Además del modelo de xenoinjerto subcutáneo descrito anteriormente, también se puede determinar el constructo conjugado de anticuerpos del agente de focalización P óptimo en un modelo de cáncer de próstata ortotópico, que imita más estrechamente el microambiente tumoral específico de la glándula prostática. Para determinar el constructo conjugado de anticuerpos del agente de focalización P óptimo, se utiliza una línea celular de cáncer de próstata luciferizada (LNCaP-Luc) para controlar el crecimiento y la regresión del tumor mediante imágenes de bioluminiscencia. El día 0, se inyectan células cancerosas ($1,0 \times 10^6$ células) en el lóbulo prostático posterior en ratones NSG de 6 semanas de edad. Después de dos semanas, se inyectan por vía intraperitoneal hPBMC recién purificadas. El crecimiento del tumor se controla dos veces por semana y se espera que se observen aumentos en la bioluminiscencia del tumor alrededor de las 4 semanas posteriores a la implantación del tumor. Antes de comenzar el tratamiento, se sangra a los ratones y se evalúa la reconstitución inmune correcta mediante la detección de células T humanas en la periferia utilizando FACS. Durante el tratamiento, se administran por vía intravenosa diariamente 0,2 ~ 1 mg/kg de conjugado de anticuerpo con agente de focalización P por hasta 10 días. El crecimiento tumoral se controla hasta 8 semanas. Los estudios de IHC se realizan para detectar células T infiltradas en la glándula prostática.

Ejemplo 6: Estudios de seguridad y eficacia en ratones inmunocompetentes

60

65

[0303] Con el fin de evaluar con precisión los fármacos y optimizar el protocolo de tratamiento, se genera un conjugado de anticuerpo sustituto de anticuerpo dirigido a P que puede reconocer células T de ratón. Un hámster monoclonal 145-2C11 que se une a CD3 de ratón (este anticuerpo también se une a la subunidad épsilon como lo hace UCHT1) se usa en la generación del conjugado de anticuerpo sustituto de agente de focalización P de ratón. La secuencia de la región variable de 145-2C11 se obtuvo de la literatura, y el gen sintético se clona en el vector de expresión pBAD para expresar Fab que contiene pAcF en *E. coli*. Estamos confirmando la unión del conjugado de anticuerpo del agente de focalización mP usando FACS y su actividad *in vitro* se mide usando mPBMC purificados. Nuestros restos enlazadores P se basan en los inhibidores de la enzima hPSMA, que han mostrado una actividad similar contra varios PSMA de diferentes orígenes, incluidos ratones, ratas, perros y monos. Por lo tanto, el compuesto enlazador DUPA

optimizado que desarrollamos en estudios previos puede conjugarse directamente con un anticuerpo anti-m-CD3 para generar rápidamente la versión sustituta de ratón del conjugado de anticuerpo del agente de focalización P (conjugado de anticuerpo del agente de focalización mP). Sin embargo, a diferencia de los humanos, los niveles de expresión de mPSMA en tejidos de próstata de ratón normales son muy bajos, y la sobreexpresión en líneas celulares conocidas de cáncer de próstata de ratón es controvertida. Para imitar los niveles de expresión de PSMA humana, por lo tanto, estamos utilizando la línea celular de cáncer de próstata de ratón RM-1 que se transduce de manera estable con PSMA humana (RM-1-hPSMA). La línea celular madre RM-1 es deficiente en MHC 1 y singénica en ratones C57BL/6 (B6) y se sabe que RM-1-hPSMA también crece bien en ratones B6 inmunocompetentes. Primero podemos confirmar la actividad *in vitro* del conjugado de anticuerpo del agente de focalización mP contra RM-1-hPSMA en presencia de mPBMC. Luego podemos medir los parámetros farmacocinéticos, que junto con los experimentos de actividad *in vitro* determinan el paradigma de dosificación para los estudios de eficacia. Para estudios *in vivo*, estamos inyectando ortotópicamente $0,5 \times 10^6$ células RM-1-hPSMA en ratones B6. En \sim día 10, cuando los tumores alcanzan $\sim 200 \text{ mm}^3$, los ratones se tratan inyectando por vía intravenosa el conjugado con anticuerpo de agente de focalización a mP. Determinamos la dosis eficaz mínima, la frecuencia de dosificación óptima y la dosis máxima tolerada. También evaluamos la inmunotoxicidad del conjugado de anticuerpos del agente de focalización mP en ratones B6 en varios órganos (p. ej., Cerebro, hígado, corazón, riñones, bazo, pulmón, etc.). Es de destacar que, aunque no ha habido una comparación directa, algunos informes sugieren que hay cantidades significativas de expresiones de mPSMA en el riñón de ratón en comparación con el humano, lo que debe considerarse durante la evaluación de la toxicidad renal. El peso corporal, los niveles elevados de citoquinas (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2, etc.) y el estado de activación de las células T (CD69 y CD25-positivo) se miden durante el tratamiento para controlar los efectos secundarios relacionados con la dosis, como el síndrome de liberación de citocinas en ratones. Creemos que los datos de eficacia dependientes de la dosis junto con la dosis máxima tolerada y los parámetros farmacocinéticos determinados en este estudio proporcionan una guía para una dosis de inicio segura en el estudio de primates no humanos, así como una mejor estimación de la dosis eficaz en el hombre.

Ejemplo 7. Generación de un conjugado de anticuerpo de agente de focalización P de reactivo cruzado de mono humano/cynomolgus y estudios de seguridad en primates no humanos

[0304] Estamos evaluando la farmacocinética y la seguridad del conjugado de anticuerpo del agente de focalización de P en un primate no humano, modelo cynomolgus macaque (cyno). Desafortunadamente, hemos determinado que el UCHT1 no es suficientemente cyno reactivo cruzado para permitir la evaluación de seguridad en los NHP. Por lo tanto, se prepara un conjugado de anticuerpo de agente de focalización P reactivo cruzado de mono humano/cynomolgus (conjugado de anticuerpo del agente de focalización dirigido cyP) mediante la conjugación del enlazador P con Fab α CD3 reactivo cruzado humano/cynomolgus (SP34), que también se une la cadena CD3 epsilon con alta afinidad ($K_d = 4 \text{ nM}$). Como SP34 se deriva originalmente del ratón, estamos haciendo una versión química o humanizada de SP34. Como se discutió anteriormente, nuestro compuesto de enlazador P debería tener una afinidad similar con los cyno-PSMA. Confirmamos la unión con células CHO transfectadas con cynoPSMA. La citotoxicidad *in vitro* contra células C4-2 se mide en presencia de cyPBMCs. También realizamos ensayos de citotoxicidad *in vitro* similares usando células T humanas y cyno T purificadas, y comparamos sus respuestas (magnitud de lisis de células diana, eficacia, estado de activación de células T y liberación de citocinas). También evaluamos la eficacia del biespecífico en el modelo de xenoinjerto C4-2 de roedores y llevamos a cabo estudios de PK, aumento de dosis y frecuencia de dosis como se describió anteriormente.

[0305] Para los estudios *in vivo* de NHP PK, los monos cynomolgus machos por vía intravenosa reciben control del vehículo o conjugado de anticuerpo del agente de focalización cyP. Se recolectarán muestras de sangre en puntos de tiempo regulares para determinar los parámetros PK. Estamos utilizando los datos de cyno PK junto con los datos del estudio de roedores PK, seguridad y eficacia para diseñar un estudio de seguridad cyno de dosis ascendente, donde grupos de tres monos cynomolgus machos reciben por vía intravenosa diferentes cantidades de conjugado de anticuerpo de agente de focalización cyP hasta tres semanas (con Charles River, SNBL o Covance). Durante el estudio de seguridad, se observa la mortalidad o morbilidad de los animales, así como signos clínicos o reacciones al tratamiento. Se realizan otros análisis que incluyen temperatura corporal, oftalmología, peso corporal, consumo de alimentos, función cardiovascular, hematología, coagulación, química del suero, análisis de orina, subtipo de linfocitos (FACS), liberación de citocinas y toxicocinética. El suero también se prepara para medir los niveles de concentración sérica del conjugado de anticuerpos del agente de focalización de cyP y para la evaluación de inmunogenicidad. Después del tratamiento, los tejidos y órganos de animales se someten a una evaluación macroscópica exhaustiva, así como a un examen histopatológico. El objetivo de estos estudios y los estudios de roedores es proporcionar los datos necesarios para un estudio de Fase I de aumento de dosis en humanos.

Ejemplo 8: Optimización de la producción de conjugado de anticuerpos del agente de focalización, pruebas de estabilidad y desarrollo de métodos bioanalíticos

[0306] En este ejemplo, estamos desarrollando un protocolo optimizado para la producción de conjugado de anticuerpo del agente de focalización de P para proporcionar suficiente material para los estudios aquí descritos. La secuencia SP34 humanizada se subclona en diferentes tipos de vectores de fermentación para detectar sistemas inducibles óptimos. También optimizamos las cepas de células de *E. coli*, así como otros parámetros de fermentación y determinamos la estabilidad del sistema de expresión. Los anticuerpos de los lotes de fermentación se comparan

con los de la expresión previa de lotes pequeños para garantizar su pureza y actividad. Las condiciones de conjugación del agente de focalización (temperatura, pH, concentraciones y relación ligando-anticuerpo) están optimizadas para reacciones a gran escala. Se prueban métodos de purificación alternativos para eliminar fácilmente el exceso de agentes de focalización después de la conjugación a gran escala. Probamos la estabilidad del suero del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P por incubación en suero humano agrupado a 37°C en condiciones estériles. Las alícuotas se analizan a intervalos cronometrados para determinar la concentración de conjugado de anticuerpos de agente de focalización P intacto y productos de degradación (p. ej., enlazadores DUPA libres) por LS-MS. La citotoxicidad *in vitro* también se realiza para determinar las concentraciones de conjugado de anticuerpo del agente de focalización P funcionalmente activo en suero. El perfil de estabilidad térmica se evalúa mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la T_m del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P en comparación con el SP34 original. La estabilidad a largo plazo se prueba a 4°C durante al menos 2 meses a diferentes concentraciones (1-50 mg/ml) en varios tampones de preformulación. También estamos desarrollando métodos bioanalíticos para determinar con mayor precisión los parámetros farmacocinéticos del conjugado de anticuerpos del agente de focalización P. En estudios farmacocinéticos, para detectar solo conjugados de anticuerpos del agente de focalización P funcionalmente intactos, se usan placas ELISA recubiertas con huPSMA para capturar el conjugado de anticuerpos del agente de focalización P en suero seguido de incubación con cadena de épsilon CD3 purificada con etiqueta de hexahistidina (etiqueta His). Después de la incubación con anticuerpos de etiqueta α His secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante, las señales se visualizan usando un kit quimioluminiscente. Para estudios de inmunogenicidad, el conjugado de anticuerpo del agente de focalización P se inmoviliza covalentemente en un chip sensor, y las respuestas de anticuerpos séricos contra el conjugado de anticuerpo del agente de focalización P se analizan mediante detección de resonancia de plasmón superficial (SPR). La especificidad de la unión al conjugado de anticuerpo del agente de focalización P observado en muestras de suero se confirma mediante experimentos de competición que usan conjugado de anticuerpo del agente de focalización P libre.

25 *Ejemplo 9: Síntesis de (S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(aminooxi))-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecano-14-ilcarbamóilo)benzamido)hexilo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-carboxipentilo)ureido)ácido pentanodioico (P-TriA)*

Síntesis de (10S, 14S)-tri-terc-butilo 2,2-dimetilo-4,12-dioxo-3-oxa-5,11,13-triazahexadecano-10,14,16-tricarboxilato

30 **[0307]** Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15A, a una solución de **1** (5,83 g, 19,7 mmol) en CH_2Cl_2 (150 ml) se añadió trifosgeno (2,92 g, 9,85 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a -78°C y se añadió lentamente Et_3N (27,5 ml, 0,197 mol). Después de agitar la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió una solución de **2** (Maindrón, N.; Poupart, S.; Hamon, M.; Langlois, J.-B.; Plé, N.; Jean, L.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 2357-2370) en CH_2Cl_2 (10 ml). Después de agitar durante 14 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada. NH_4Cl . La capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se concentró *a vacío*. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 1:3) para proporcionar 11,2 g (97%) de **3** como un aceite amarillo pálido: R_f 0,5 (EtOAc: *n*-hexano = 1:2); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,50 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 5,46 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 5,01 (s, 1H), 4,31 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 2,26 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,41 (s, 9H), 1,40 (s, 9H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,32 (m, 4H); LR-MS (ESI+) m/z 588 (M+H⁺).

Síntesis de (S)-di-terc-butilo 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexano-2-ilo)ureido)pentanodioato

45 **[0308]** Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15B, a una solución de **3** (10,8 g, 18,4 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) se añadieron 2,6-lutidina (4,29 ml, 36,8 mmol) y TMSOTf (5,00 ml, 27,6 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con MeOH y se concentró *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 3:1 a MeOH: EtOAc = 1:10) para proporcionar 8,09 g (90%) de **4** como un aceite amarillo: R_f 0,4 (MeOH: EtOAc = 1:10); LR-MS (ESI+) m/z 488 (M+H⁺).

Síntesis de (S)-di-terc-butilo 2-(3-((S)-6-azido-1-terc-butoxi-1-oxohexano-2-ilo)ureido)pentanodioato

55 **[0309]** Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15C, a una solución de azida de sodio (1,55 g, 23,8 mmol) en CH_3CN (30 ml) se añadió gota a gota Tf_2O (3,20 ml, 19,0 mmol) a 0°C. Después de 1 hora, a una solución de **4** (5,80 g, 11,9 mmol), Et_3N (4,98 ml, 35,7 ml) y CuSO_4 (38,0 mg, 0,238 mmol) en CH_3CN (ml) se añadió gota a gota por encima de la azida triflico solución a 0°C. Después de agitar durante 14 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH_4Cl . La capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se concentró *a vacío*. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 1:3) para proporcionar 3,20 g (52%) de **5** como un sólido blanco: R_f 0,3 (EtOAc: *n*-hexano = 1:2); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,33 (s, 2H), 5,22 (m, 2H), 4,28 (m, 2H), 3,26 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 2,28 (m, 2H), 2,02 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,61 (m, 3H), 1,46 (s, 18H), 1,43 (s, 9H); LR-MS (ESI+) m/z 514 (M+H⁺).

65 Síntesis de terc-butilo oct-7-inilcarbamato

[0310] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15D, a una solución de **6** (Coutrot, F.; Romuald, C.; Busseron, E. *Org. Lett.*, 2008, 10, 3741-3744) (101 mg, 0.807 mmol) en THF/H₂O (4/4 ml) se añadieron NaHCO₃ (102 mg, 1,21 mmol) y Boc₂O (0,210 ml, 0,968 mmol). Después de agitar durante 14 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH₄Cl. La capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 1:7) para proporcionar 144 mg (79%) de **7** como un aceite amarillo pálido: *R_f* 0,5 (EtOAc: *n*-hexano = 1 : 7); LR-MS (ESI+) *m/z* 226 (M+H⁺).

Síntesis de (S)-di-terc-butilo 2-(3-((S)-1-terc-butoxi-6-(4-(6-(terc-butoxicarbonilamino)hexilo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-oxohexano-2-ilo)ureido)pentanodioato

[0311] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15E, a una solución de **5** (770 mg, 1,25 mmol), **7** (309 mg, 1,37 mmol) y ascorbato de sodio (99,1 mg, 0,500 mmol) en THF (20 ml) se añadió una solución de CuSO₄ · H₂O (62,4 mg, 0,250 mmol) en H₂O (3,2 ml). Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente, la capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 2:1) para proporcionar 644 mg (70%) de **8** como un sólido blanco: *R_f* 0,3 (EtOAc: *n*-hexano = 2:1); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,28 (m, 2H), 4,57 (s, 1H), 4,30 (m, 4H), 3,08 (m, 2H), 2,67 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 2,30 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,64 (m, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,41 (s, 27H), 1,37 (m, 8 H); LR-MS (ESI+) *m/z* 739 (M+H⁺).

Síntesis de (S)-di-terc-butilo 2-(3-((S)-6-(4-(6-aminohexil)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-terc-butoxi-1-oxohexano-2-ilo)ureido)pentanodioato

[0312] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15F, a una solución de **8** (644 mg, 0,872 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadieron 2,6-lutidina (0,200 ml, 1,74 mmol) y TMSOTf (0,240 ml, 1,31 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con MeOH y se concentró *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna sobre gel de sílice (EtOAc: *n*-hexano = 3:1 a MeOH: EtOAc = 1:10) para proporcionar 351 mg (63%) de **9** como un aceite amarillo: *R_f* 0,2 (MeOH : EtOAc = 1:10); LR-MS (ESI+) *m/z* 639 (M+H⁺).

Síntesis de 4-(2,2-dimetilo-4,8-dioxo-3,6,12,15,18-pentaoxa-5,9-diazaicosan-20-ilcarbamoilo)benzoato de metilo

[0313] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15G, a una solución de **10** (Hagemeyer, C; Peter, K.; Johnston, APR; Owen, D. *PCT Int. Appl. WO 2012142659 A1*, 2012) (74,5 mg, 0,209 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL) se añadieron *i*-PrNEt (54,7 µL, 0,314 mmol) y éster metílico de 4-(clorocarbonilo)ácido benzoico (125 mg, 0,627 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 12 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH₄Cl. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH: AcOEt = 1:20) para proporcionar 98,1 mg (89%) de **11** como un aceite amarillo pálido: *R_f* 0,4 (MeOH: EtOAc = 1:10); LR-MS (ESI+) *m/z* 550 (M+Na⁺).

Síntesis de 4-(2,2-dimetilo-4,8-dioxo-3,6,12,15,18-pentaoxa-5,9-diazaicosano-20-ilcarbamoilo)ácido benzoico

[0314] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15H, a una solución de **11** (200 mg, 0,379 mmol) en THF/H₂O (5/5 ml) se añadió LiOH·H₂O (23,9 mg, 0,569 mmol). Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se acidificó con 2*N* HCl. La capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH: EtOAc = 1:7) para proporcionar 118 mg (74%) de **12** como un aceite amarillo pálido: *R_f* 0,2 (MeOH: EtOAc = 1:7); LR-MS (ESI+) *m/z* 536 (M+Na⁺).

Síntesis de (S)-di-terc-butilo 2-(3-((S)-1-terc-butoxi-6-(4-(6-(4-(2,2-dimetilo-4,8-dioxo)-3,6,12,15,18-pentaoxa-5,9-diazaicosano-20-ilcarbamoilo)benzamido)hexilo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-oxohexano-2-ilo)ureido)pentanodioato

[0315] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG. 15I, a una solución de **9** (45,8 mg, 71,7 µMol) y **12** (43,8 mg, 71,7 µMol) en DMF (5 mL) se agregaron EDCI (41,2 mg, 0,215 mmol), HOBt (29,1 mg, 0,215 mmol) y Et₃N (30,0 µL, 0,215 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 14 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH₄Cl. La capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna sobre gel de sílice (MeOH: EtOAc = 1:15) para proporcionar 22,0 mg (27%) de **13** como un aceite amarillo pálido: LR-MS (ESI+) *m/z* 1134 (M+H⁺).

Síntesis de (S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(aminooxy)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecano-14-ilcarbamoilo)benzamido)hexilo)-1H-1,2,3-triazol-1-ilo)-1-carboxipentilo)ureido)ácido pentanodioico (P-TriA)

[0316] Como se muestra en el esquema de reacción representado en la FIG., 15J a una solución de **13** (26,6 mg, 23,4 µMol) en CH₂Cl₂ (1,5 ml) se añadió TFA (1,5 ml). Después de agitar durante 14 h a temperatura ambiente, la mezcla

de reacción se concentró *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna sobre gel de sílice (MeOH: EtOAc = 1:15) para proporcionar 20,1 mg (99%) de **14** como un aceite amarillo pálido: LR-MS (ESI+) *m/z* 866 (M+H⁺). El análisis ESI-MS y el espectro de masa desconvolucionado de P-TriaA (compuesto 14) conjugado con un mutante Fab anti-CD3 (UCHT1) pAcF (LC-202X/HC-138X) se representan en la FIG. 15K y 15L, respectivamente.

5

Tabla 8. Secuencias de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o agentes de focalización (los sitios para la incorporación de aminoácidos no naturales UCHT1 están subrayados)

	Descripción	SECUENCIA
1	Cadena ligera de un clon anti-CD3 de UCHT1	ATGAAAAAGAATATCGCATTCTTCTTGCTAGC ATGTTTCGTTTTTCTATTGCTACAAACGCATAC GCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATCCGTAATT ATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATTATACCTCCCGC CTGGAGTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG CTCTGGATCTGGGACAGATTAACTCTGACCAT CAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAACAGGGTAATACTCTGCCGTGG ACGTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGTCCTCG CCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T

(Continuación)

	Descripción	SECUENCIA
2	Cadena pesada de un clon anti-CD3 de UCHT1	ATGAAAAAGAATATCGCATTTCCTTCTTGCATCT ATGTTTCGTTTTTTTCTATTGCTACAAACGCGTAC GCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGG CTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGGTACTCCTTTACCGGCTA CACTATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTTCGCACTGATTAATCCT TATAAAGGTGTTTTCCACCTATAACCAGAAATTC AAGGATCGATTACCATCTCCGTAGATAAATC CAAAAACACGGCGTATCTTCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCTAGAAGCGGATACTACGGCGATAGTGACTG GTATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGT GCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACCTCACACA
3	SS-14 (análogo de somatostatina)	Ala-Gly-cyclo(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)
4	OC (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
5	TOC (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
6	TATE (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
7	NOC (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
8	NOC-ATE (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
9	BOC (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
10	BOC-ATE (análogo de somatostatina)	D-Phe1-cyclo(Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
11	KE108 (análogo de somatostatina)	Tyr-ciclo(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)
12	LM3 (análogo de somatostatina)	p-CI-Phe-cyclo(D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-LysThr-Cys)D-Tyr-NH2
13	BN (análogo de bombesina)	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2

(Continuación)

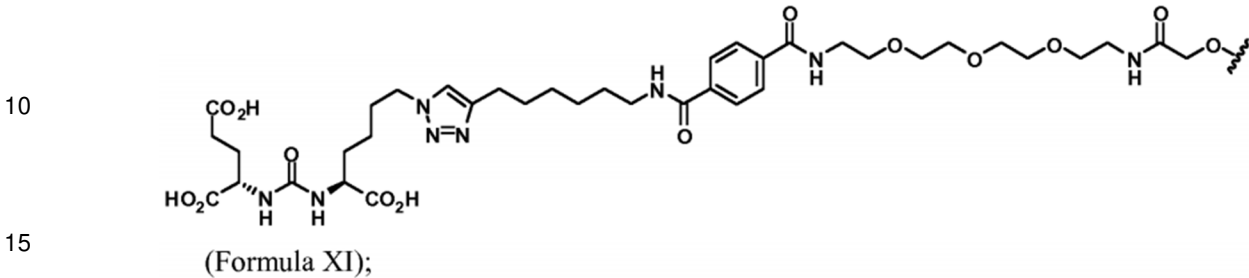
	Descripción	SECUENCIA
14	RP527 (bomba análoga)	N3S-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH2]
15	Demobesina 1 (análogo de bombesina)	N40-1-bzlg0 [D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NHEt13]
16	Demobesina 4 (análogo de bombesina)	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14- NH2]
17	BBS-38 (análogo de bombesina)	(NaHis)Ac-β-Ala-β-Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14- NH2]
18	BAY 86-4367 (análogo de bombesina)	3-ciano-4-trimetilamonio-benzoílo-Ala(SO3H)-Ala(SO3H)-Ava[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NmeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH2]
19	MG (análogo de minigastrina)	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
20	MG0 (análogo de minigastrina)	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH2
21	MG11 (análogo de minigastrina)	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
22	H2-Met (análogo de minigastrina)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
23	H2-Nle (análogo de minigastrina)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
24	Demogastrina (análogo de minigastrina)	N4-D-Glu-(Glu) 5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
25	Cyclo-MG1 (análogo de minigastrina)	c(y-D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH2
26	MGD5 (análogo de minigastrina)	Gly-Ser-Cys(succinimidopropionilo-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH2
27	Buserelina (análogo de GnRH)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
28	Goserelina (análogo de GnRH)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Ser(tBu) 6-Leu7-Arg8-Pro9-AzGly10-NH2
29	Leuprolida (análogo de GnRH)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Leu6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
30	Nafarelina (análogo de GnRH)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Nal (2) 6-Leu7-Arg8-Pro9-NHC2H5
31	Triptorelina (análogo de GnRH)	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-D-Trp6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH2
32	Abarelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Ala1-D-Cpa2-D-Ala3-Ser4-Tyr5-D-Asp6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
33	Acilina (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
34	Antarelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
35	Antide (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
36	Azaline B (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph (Atz) 5-D-Aph(Atz)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
37	Cetrorelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
38	Degarelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(L-hidroorotilo)5-D-Aph(carbomoílo)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
39	Ganirelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-hArg (Et)6-Leu7-hArg (Et)8-Pro9-D-Ala10-NH2
40	Ozarelix (análogo de GnRH)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-N-MeTyr5-D-hCit6-Nle7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2

[0317] Todos los ejemplos y el lenguaje condicional que se mencionan en este documento están destinados

- principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para avanzar en la técnica, y deben interpretarse como no limitados a tales ejemplos y condiciones específicamente citadas. Además, todas las declaraciones en el presente documento que mencionan principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como ejemplos específicos de la misma, pretenden abarcar tanto sus
- 5 equivalentes estructurales como funcionales. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto los equivalentes actualmente conocidos como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura.
- 10 **[0318]** Si bien las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

REIVINDICACIONES

5 **1.** Un conjugado de anticuerpo del agente de focalización que comprende: (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un correceptor de células T CD3, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de anticuerpo un aminoácido no natural, y (b) un compuesto de Fórmula XI que se une a una célula diana:



20 en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al correceptor de células T CD3 no se une a la célula diana;
 en donde el compuesto de Fórmula XI está conectado al aminoácido no natural.

2. El conjugado de anticuerpo del agente de focalización de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un fragmento Fab anti-CD3.

25 **3.** El conjugado de anticuerpo del agente de focalización de la reivindicación 1, en donde el aminoácido no natural del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una p-acetilfenilalanina (pAcF) o una selenocisteína.

4. El conjugado de anticuerpo de agente de focalización de la reivindicación 3, en donde el aminoácido no natural es p-acetilfenilalanina.

30 **5.** Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo del agente de focalización de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

FIG. 1

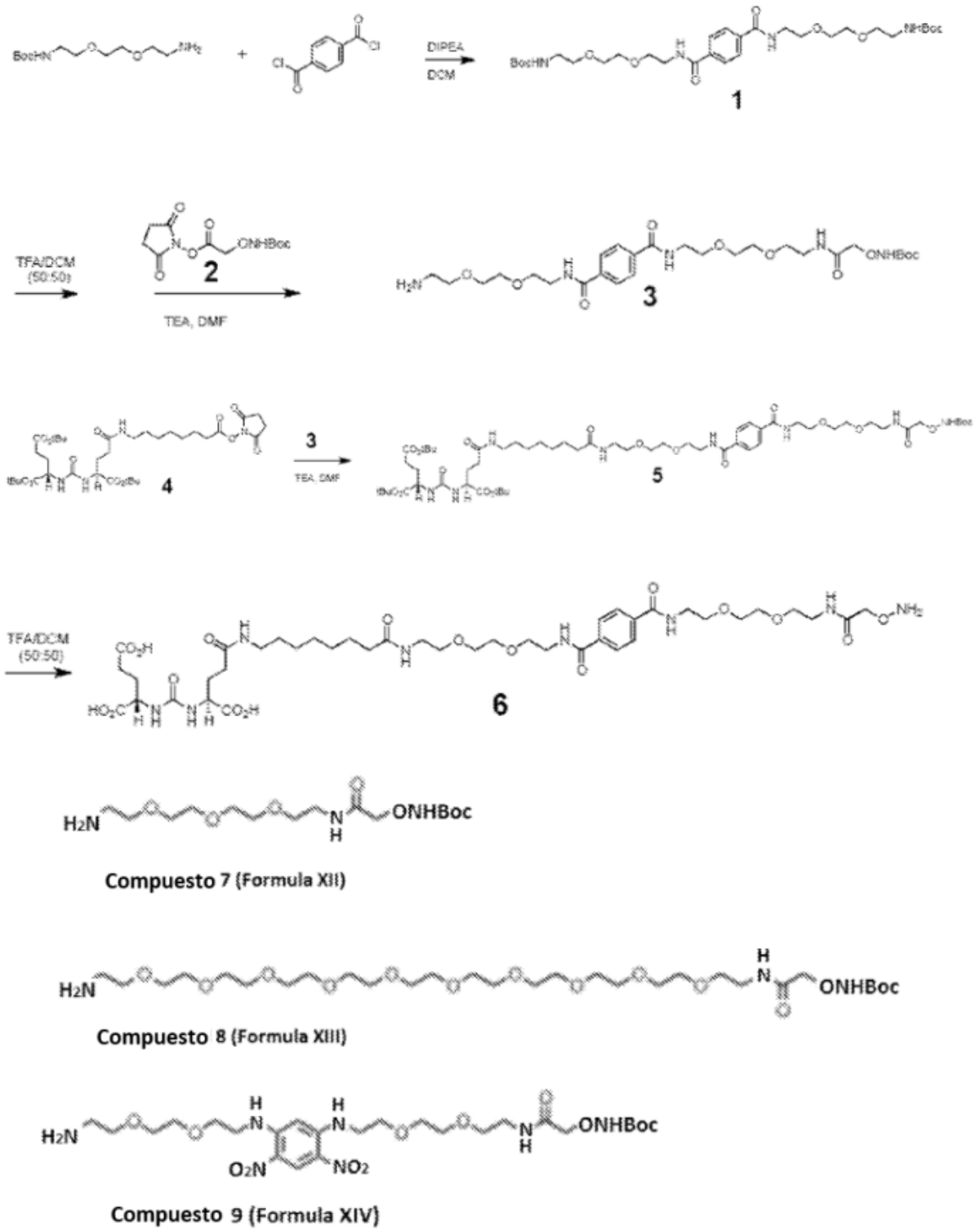


FIG. 2

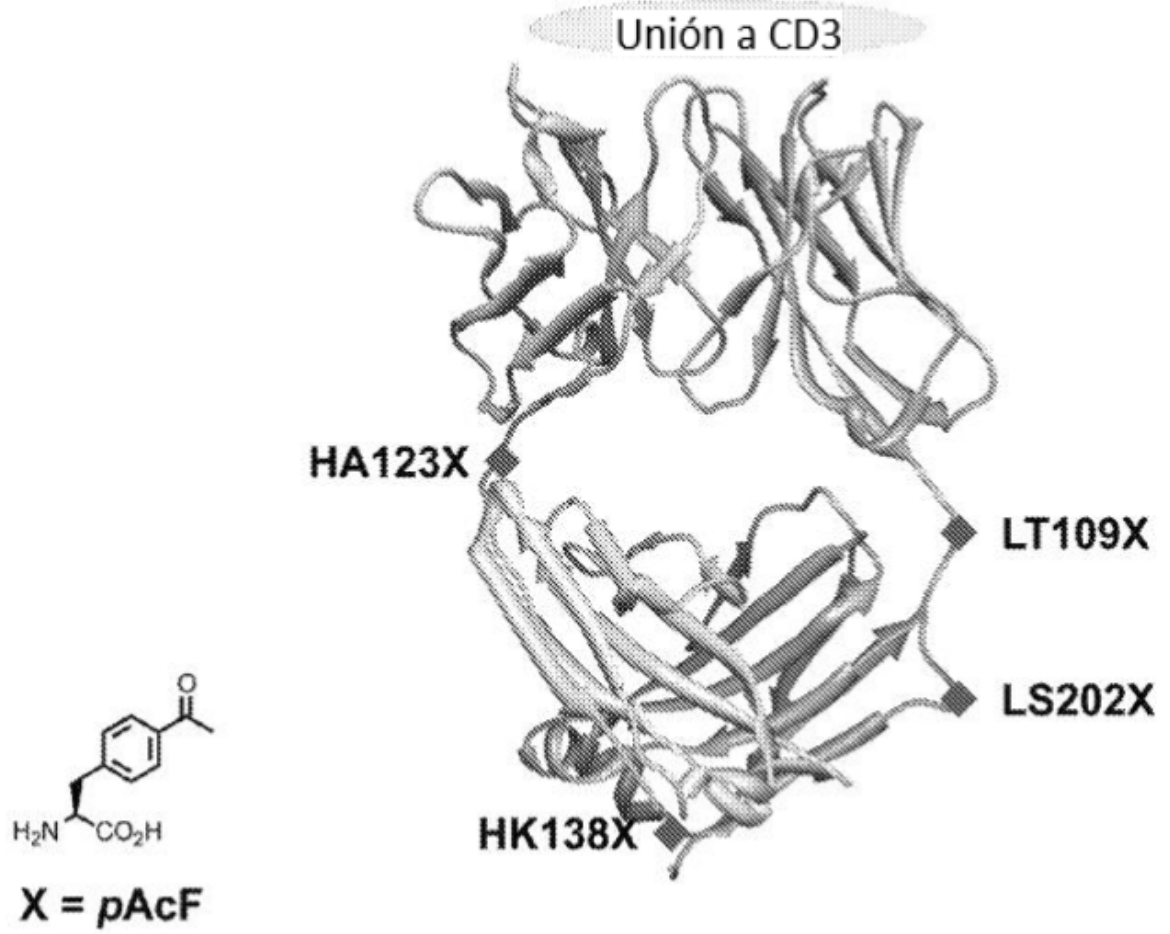


FIG. 3A

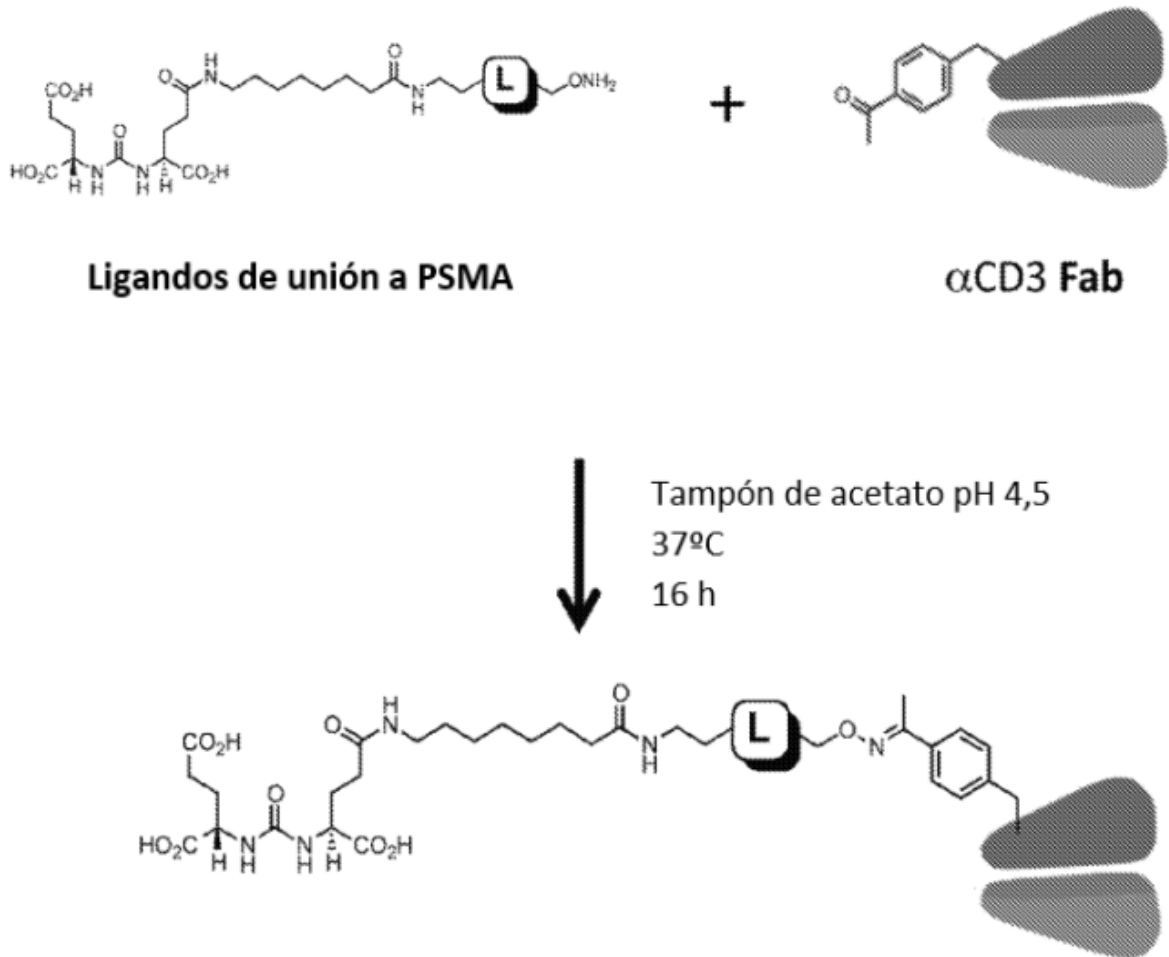


FIG. 3B

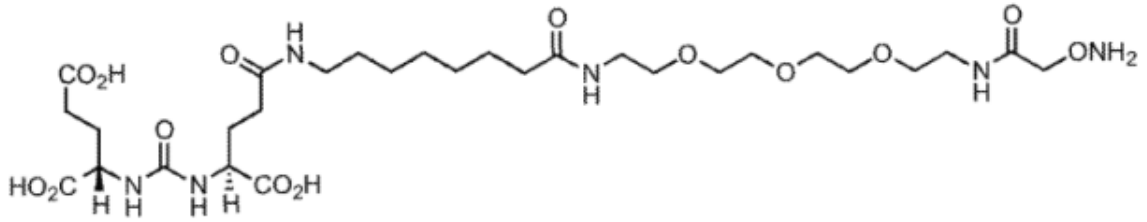


FIG. 3C

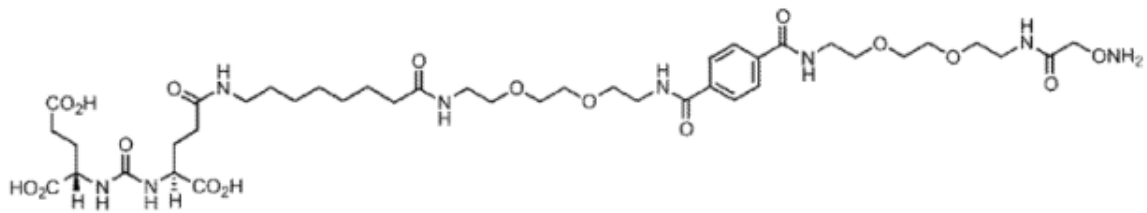


FIG. 3D

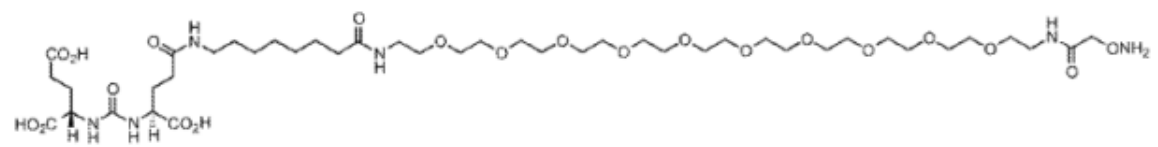


FIG. 3E

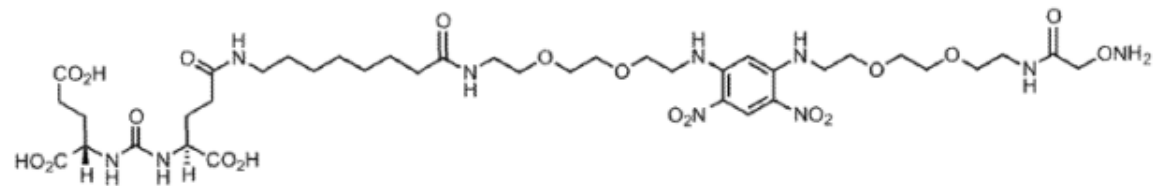


FIG. 4A

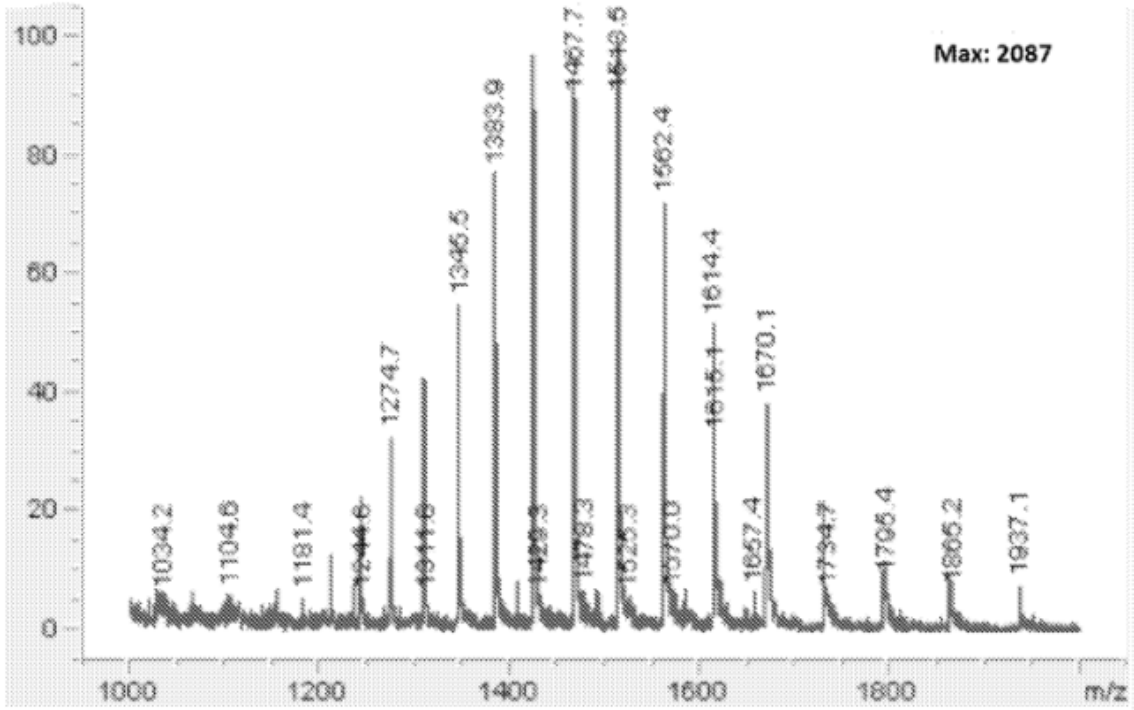


FIG. 4B

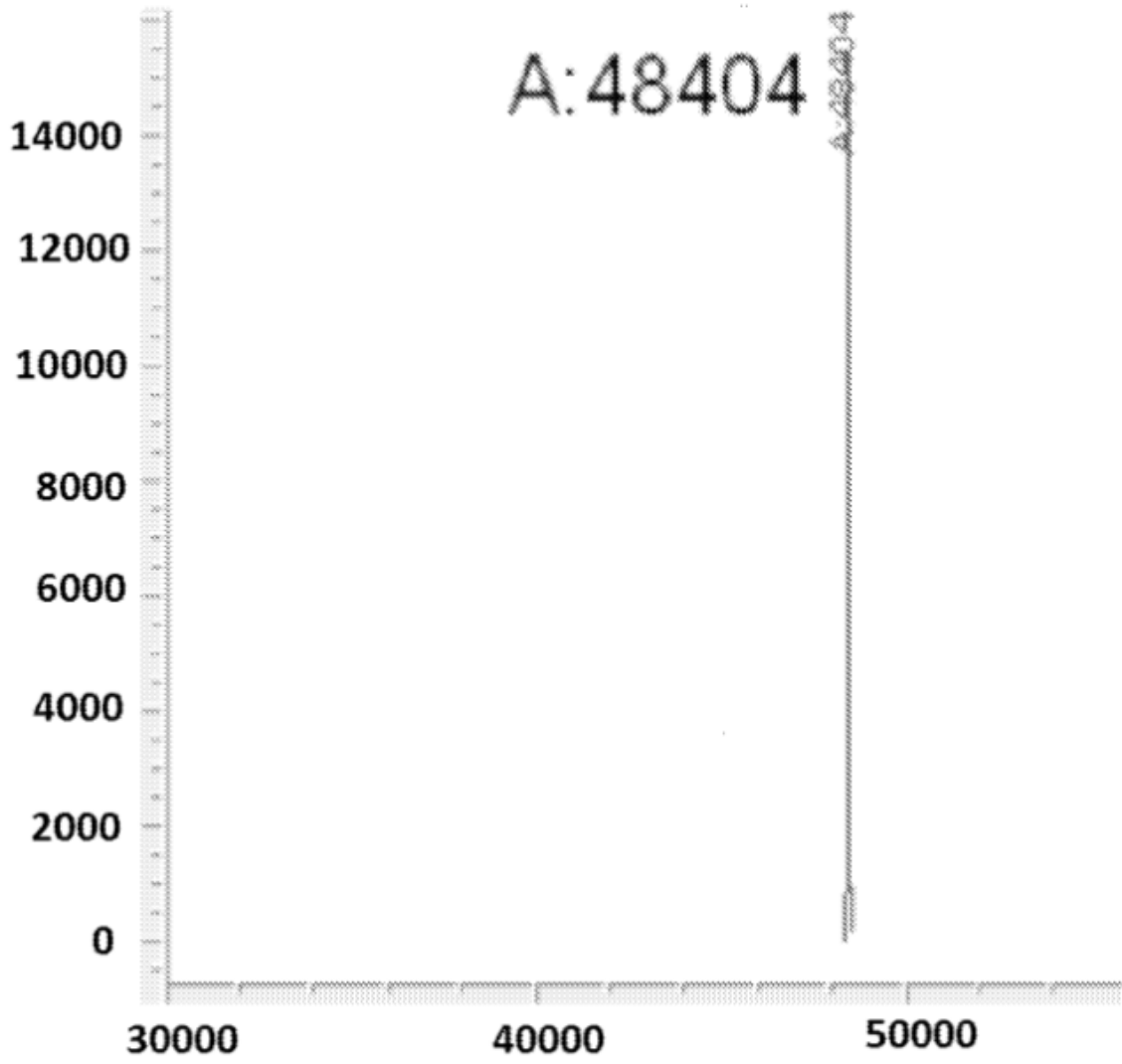


FIG. 4C

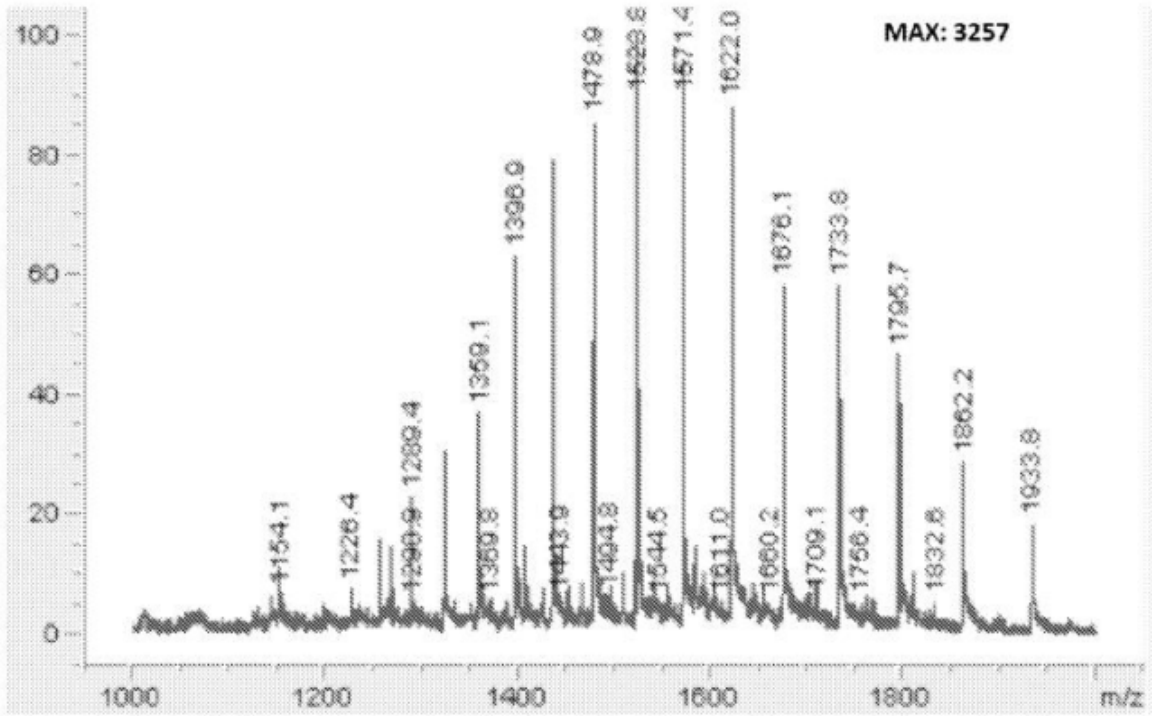


FIG. 4D

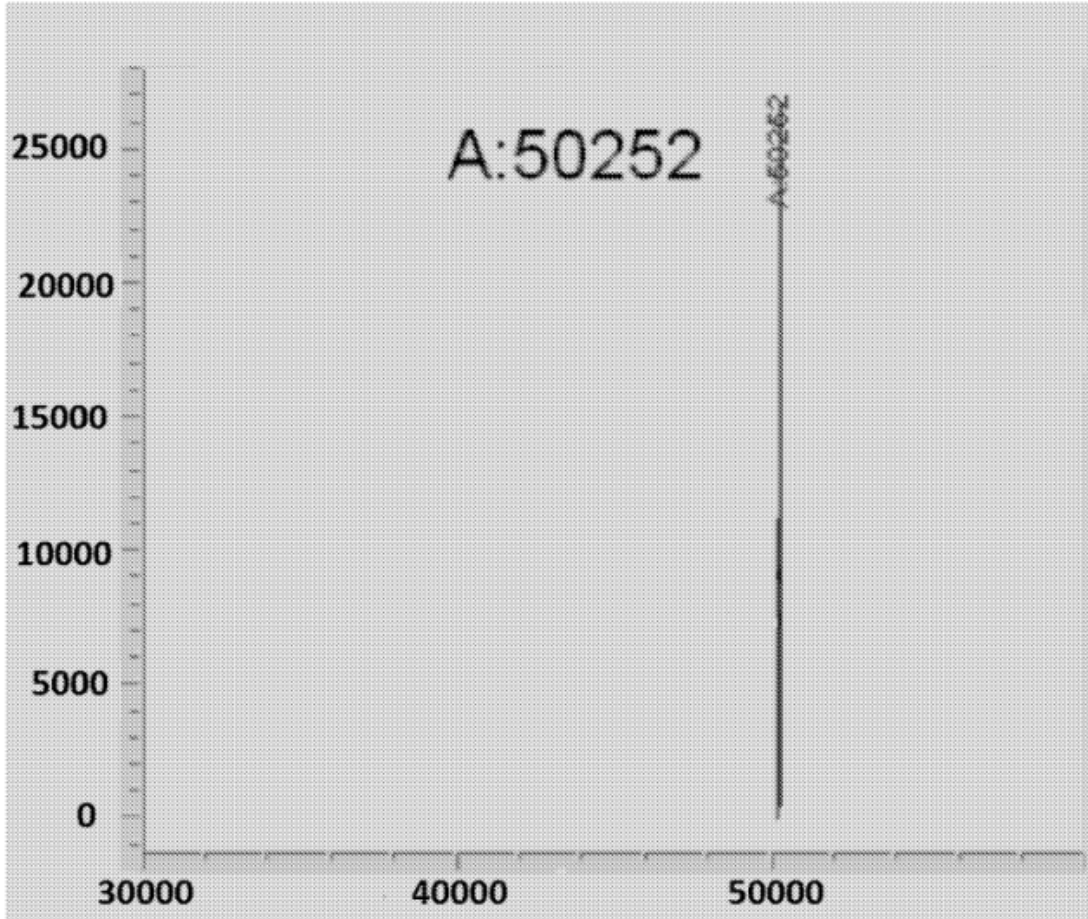


FIG. 5A

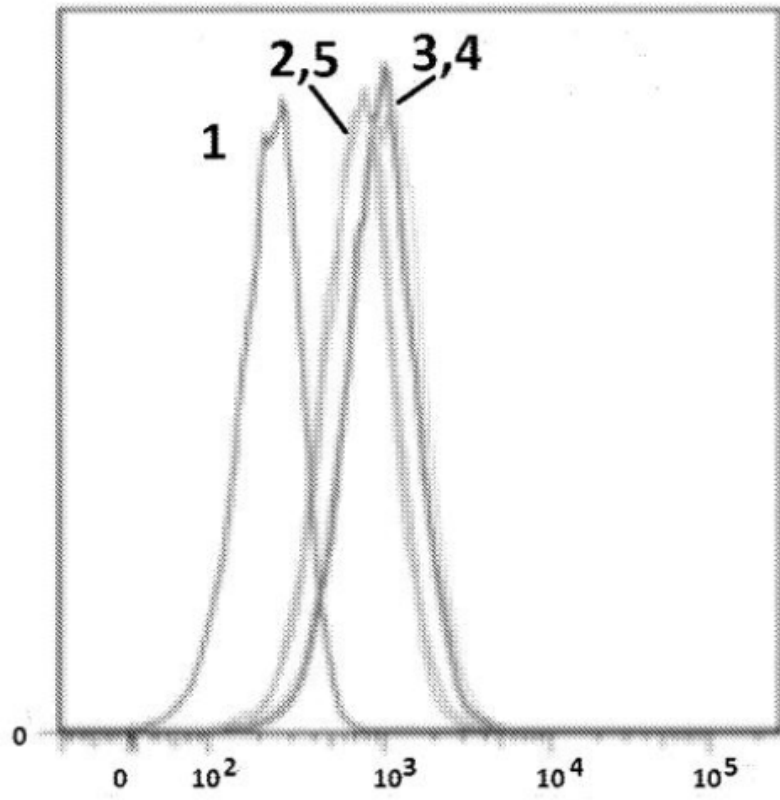


FIG. 5B

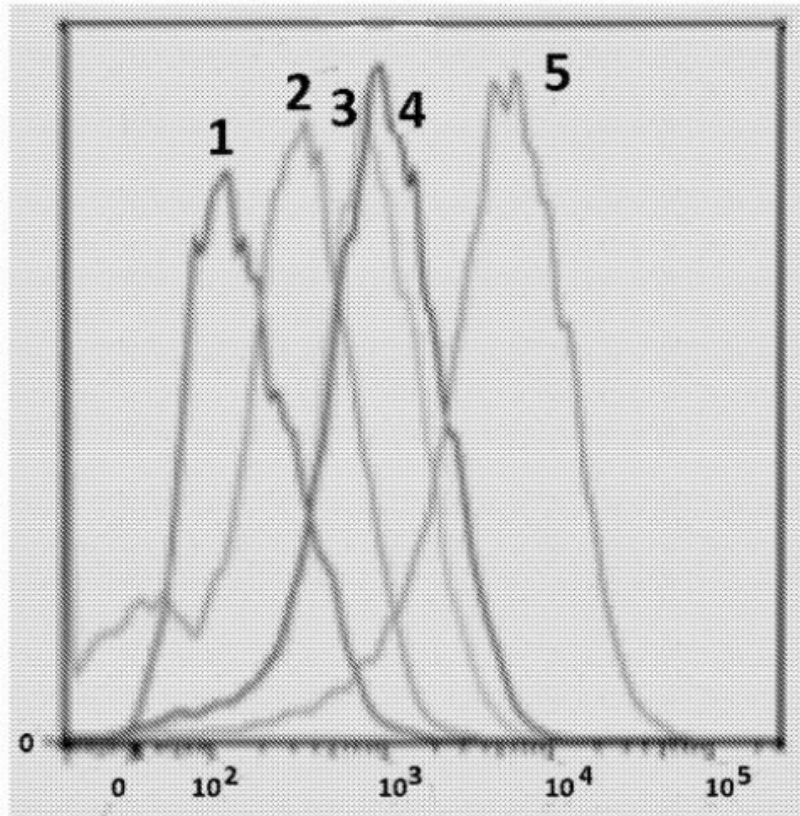


FIG. 5C

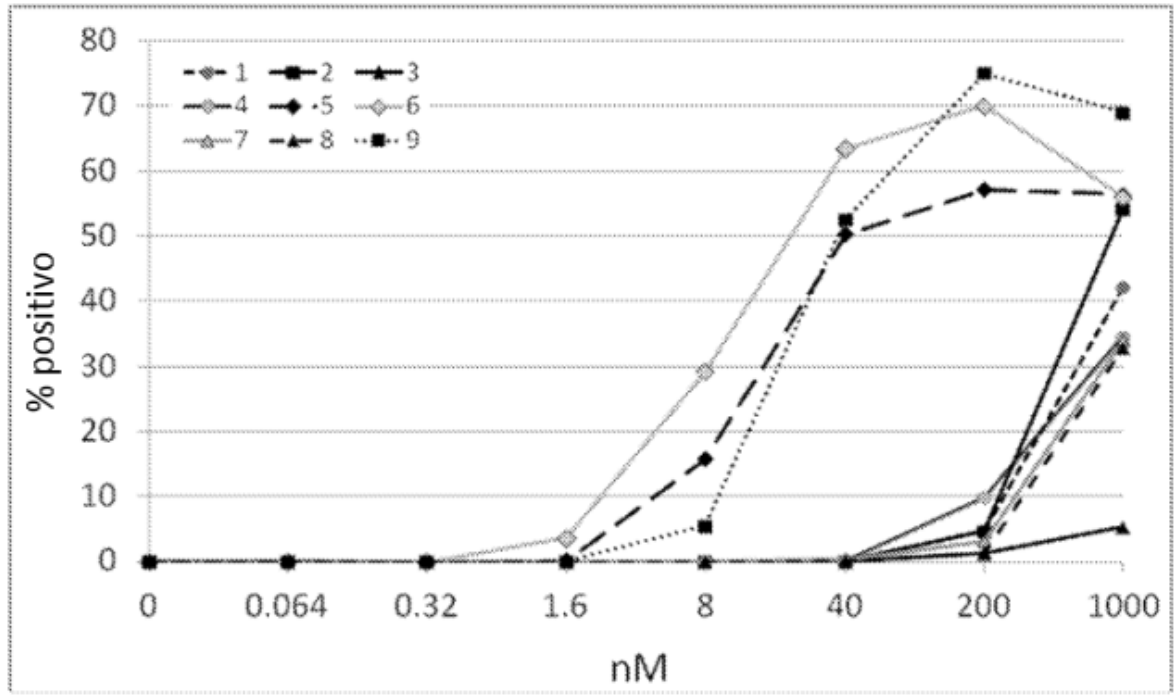


FIG. 6A

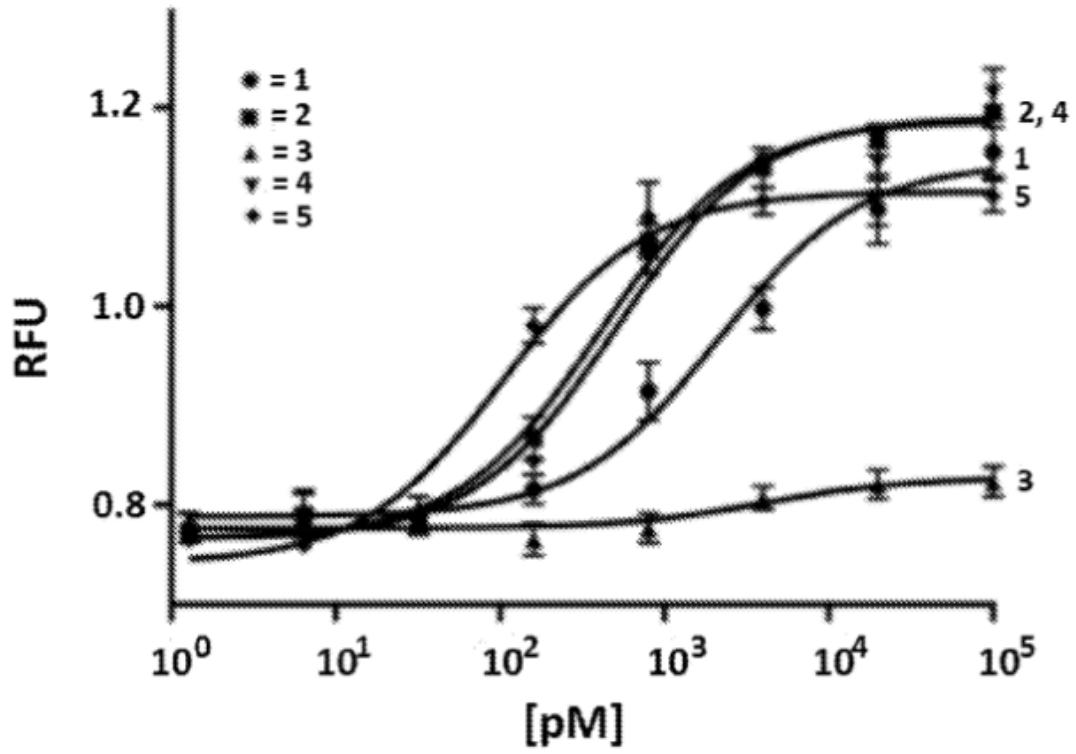


FIG. 6B

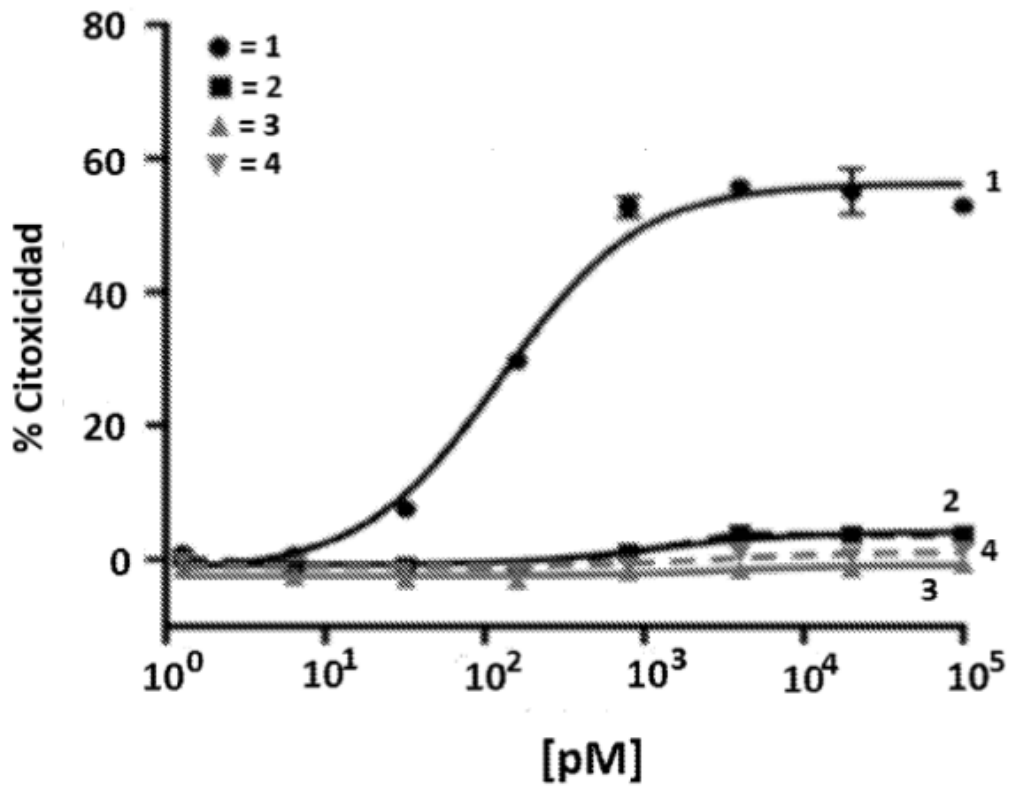


FIG. 6C

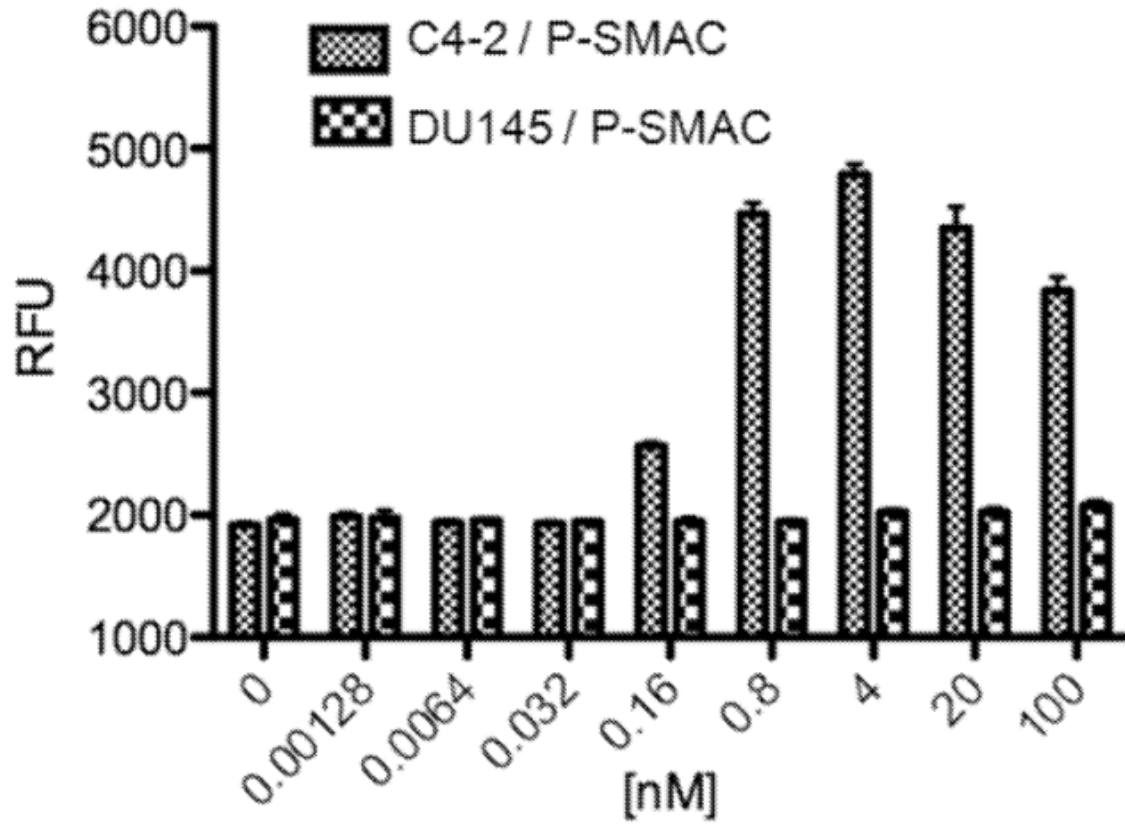


FIG. 7A

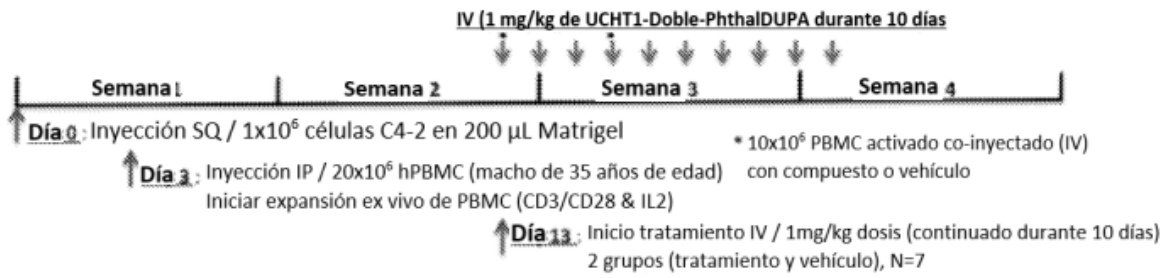


FIG. 7B

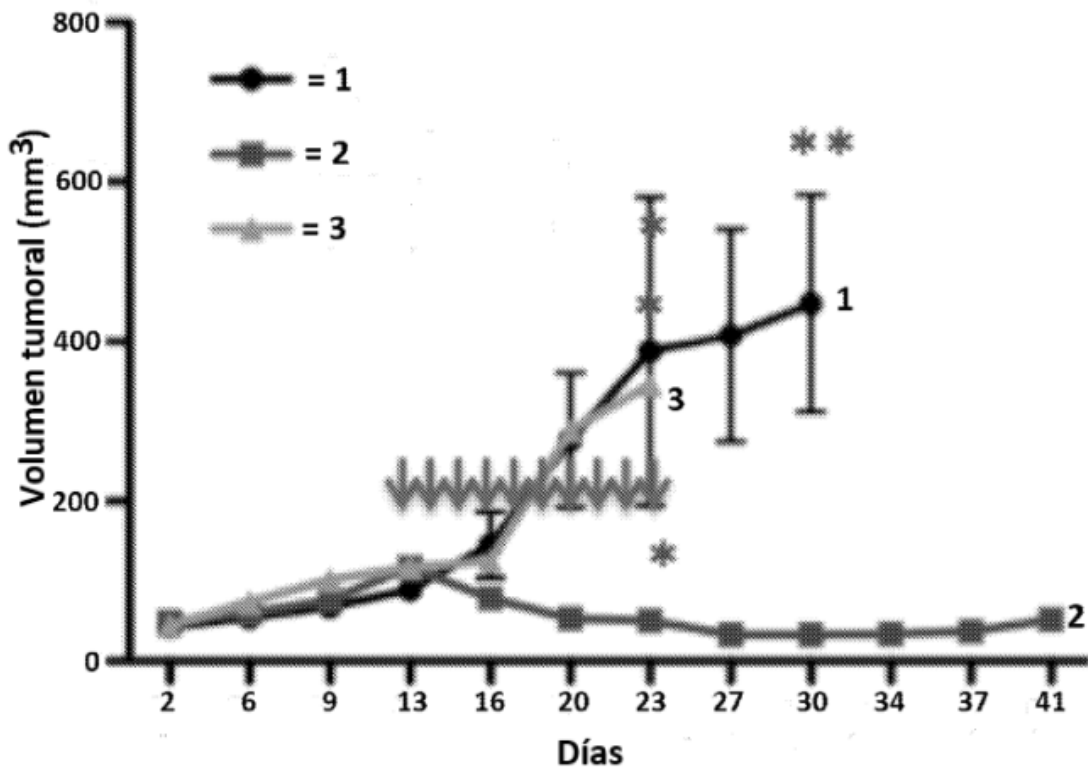
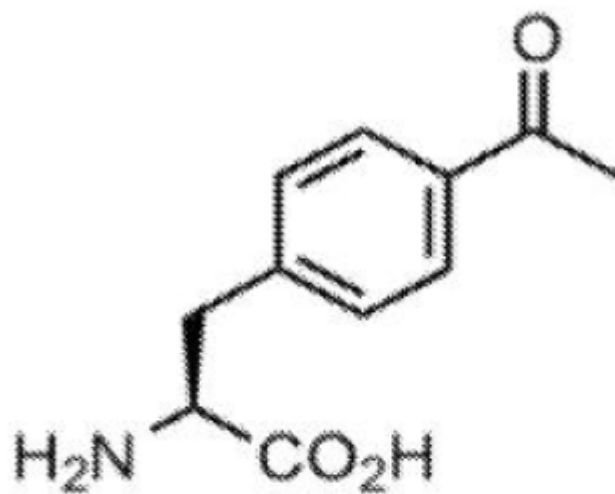
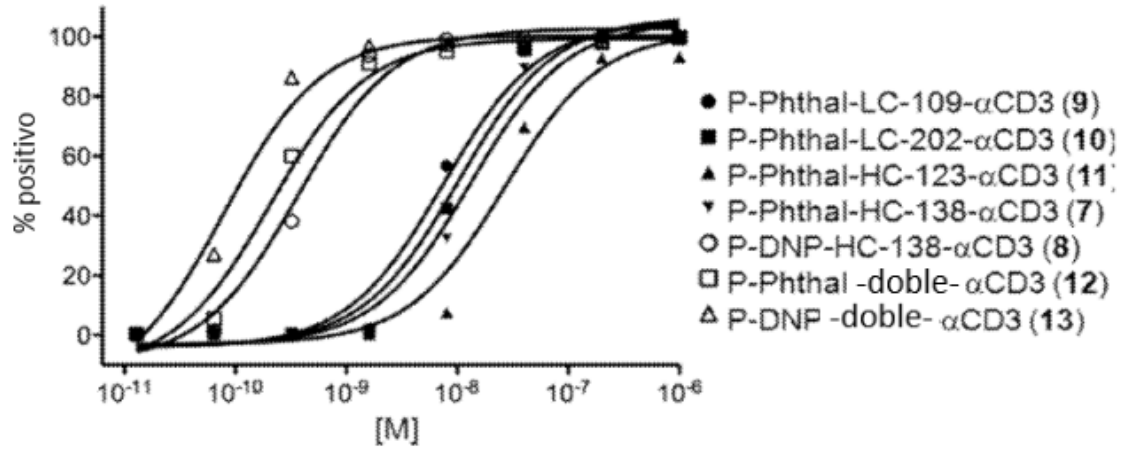


FIG. 8



pAcF, 1

FIG. 9



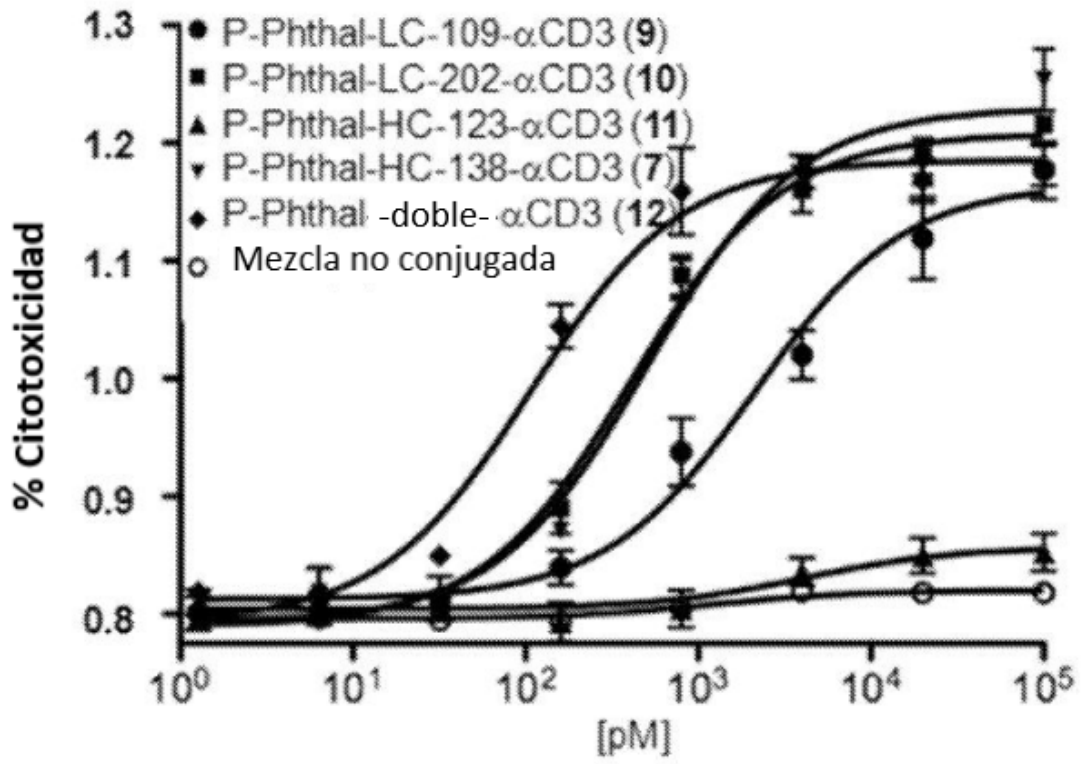


FIG. 11

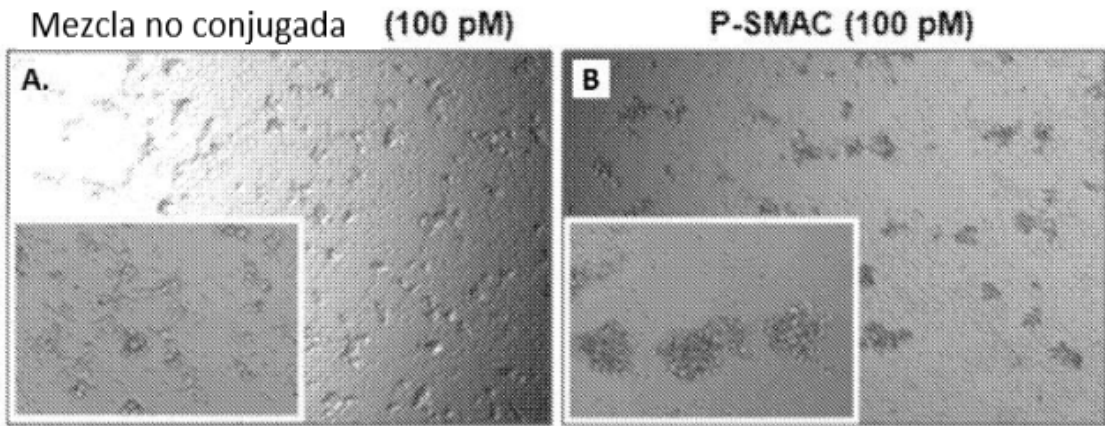


FIG. 12

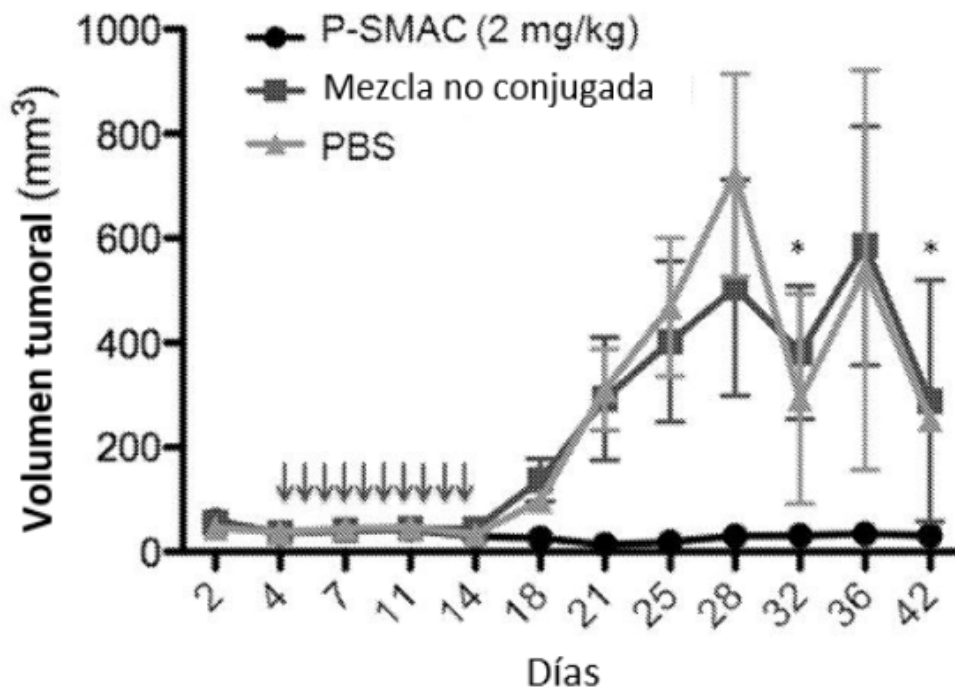


FIG. 13

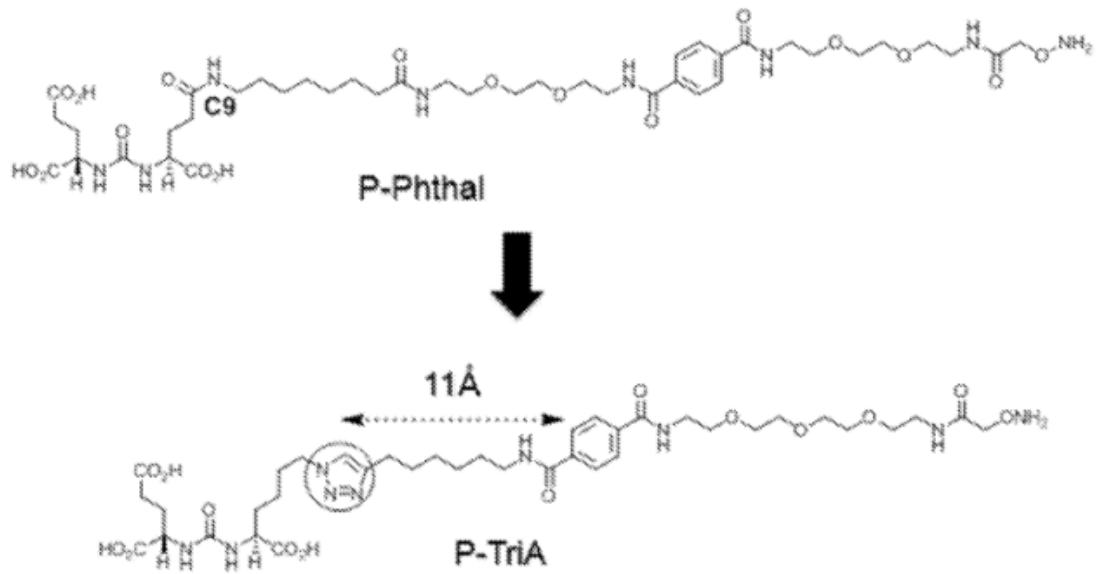


FIG. 14

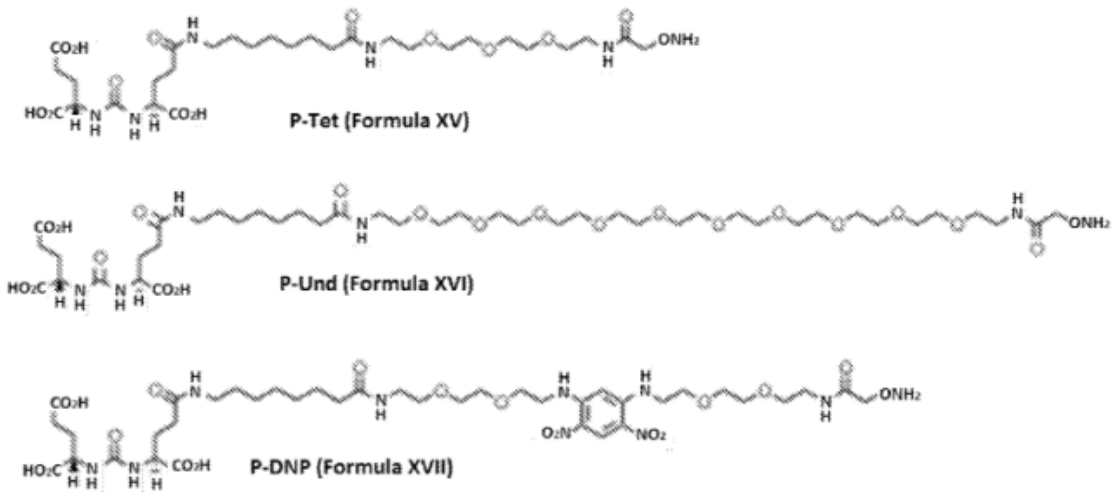


FIG. 15A

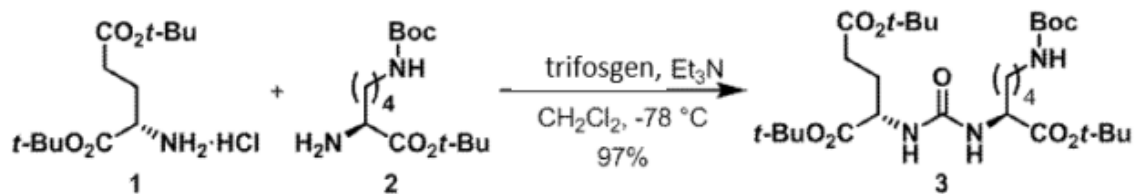


FIG. 15B

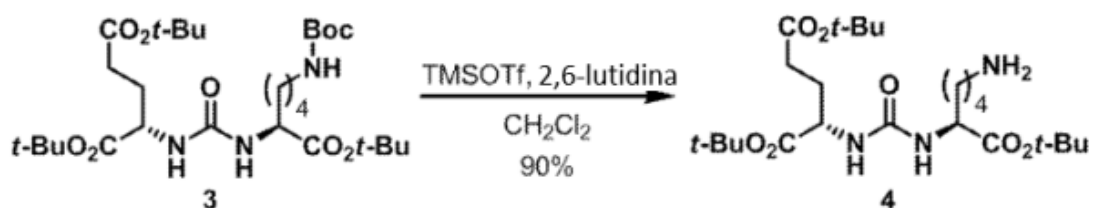


FIG. 15C

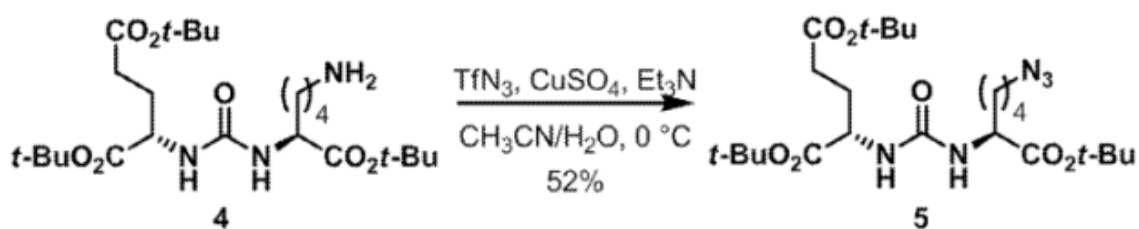


FIG. 15D

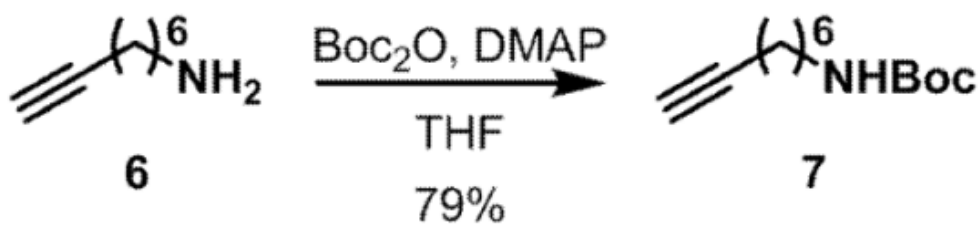


FIG. 15E

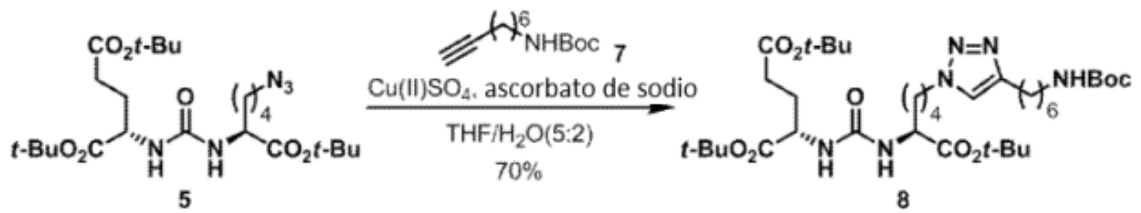


FIG. 15F

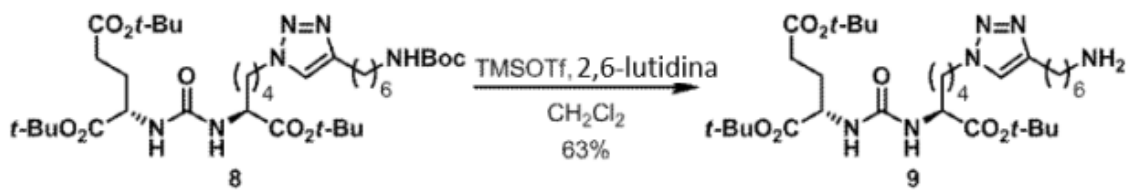


FIG. 15G

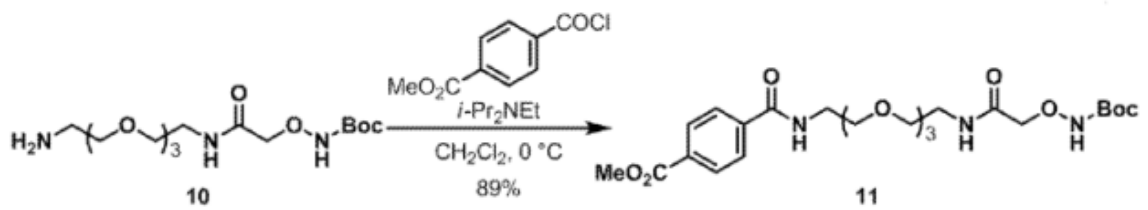


FIG. 15H

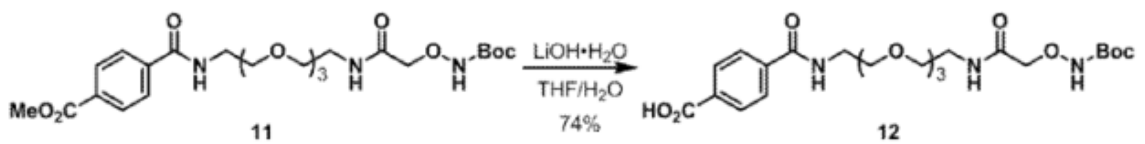


FIG. 15I

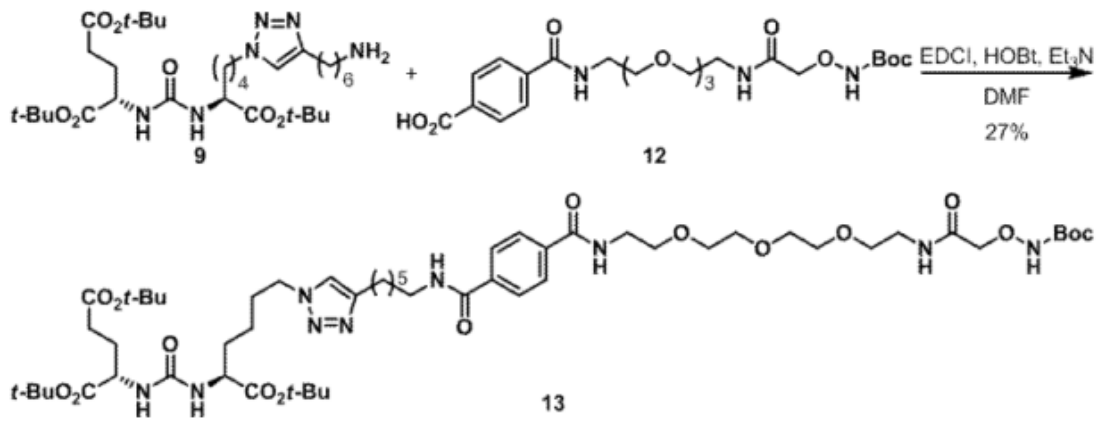


FIG. 15J

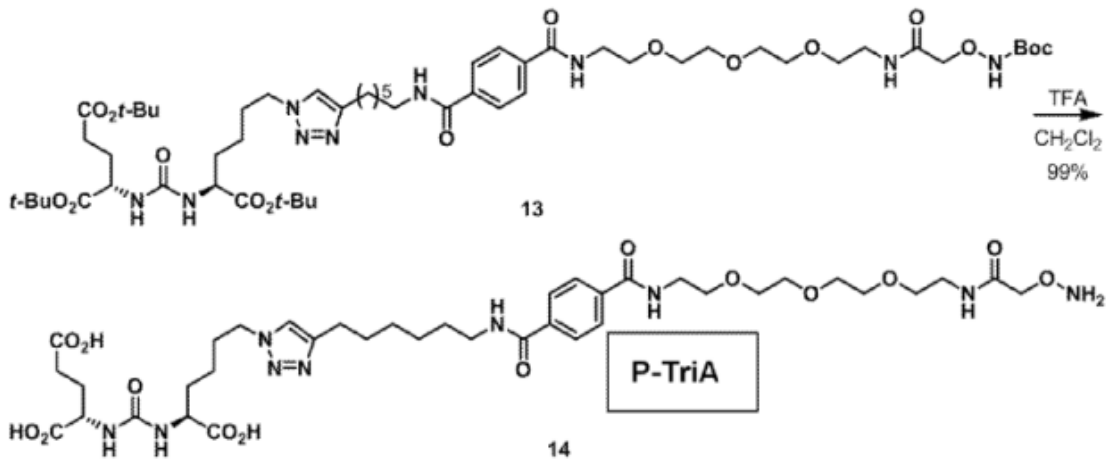


FIG. 15K

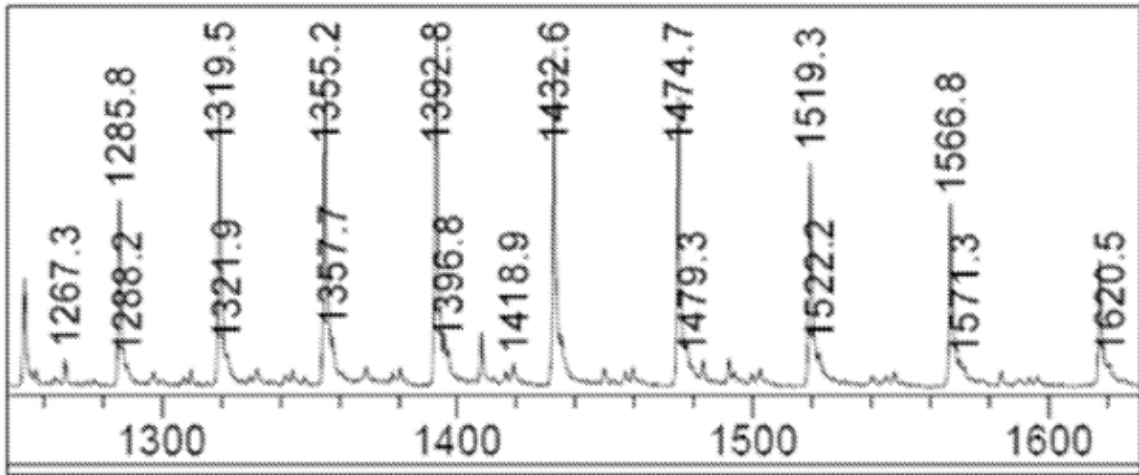


FIG. 15L

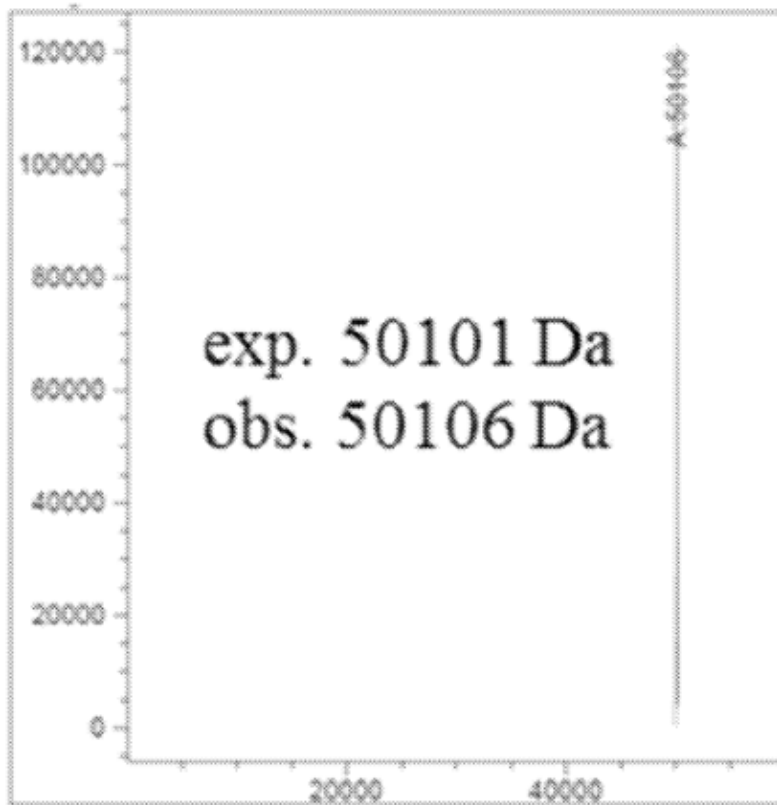


FIG. 16A

Ensayo de inhibición de PSMA

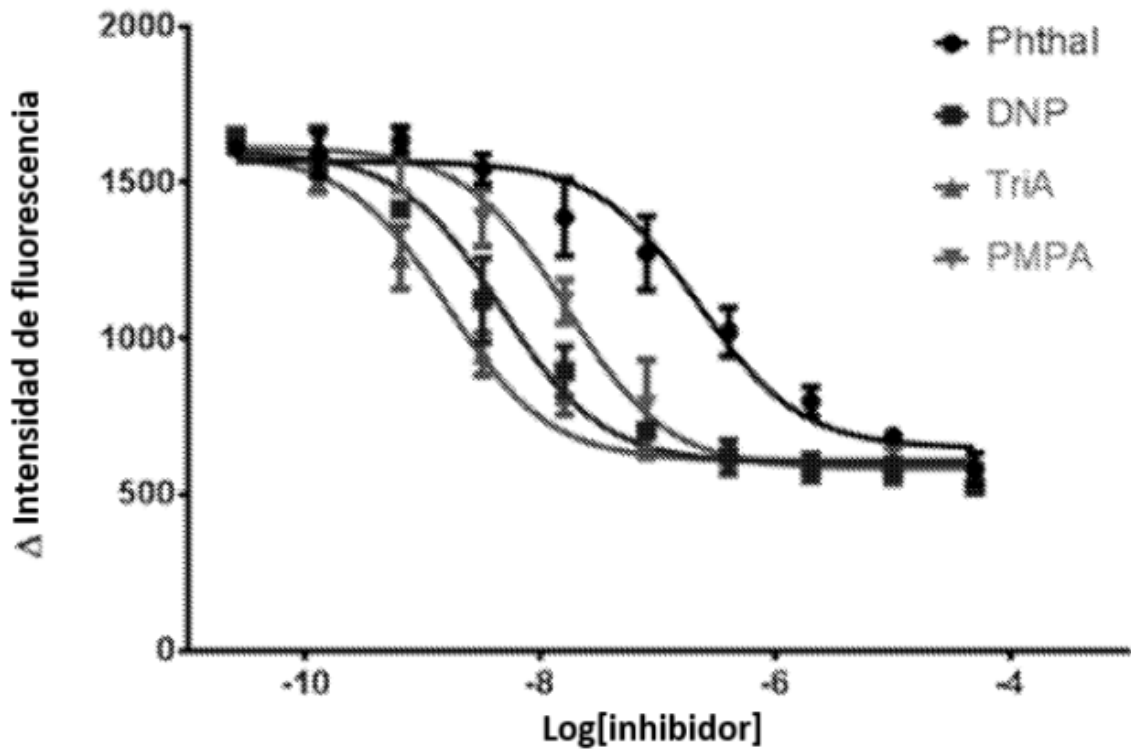


FIG. 16B

Km

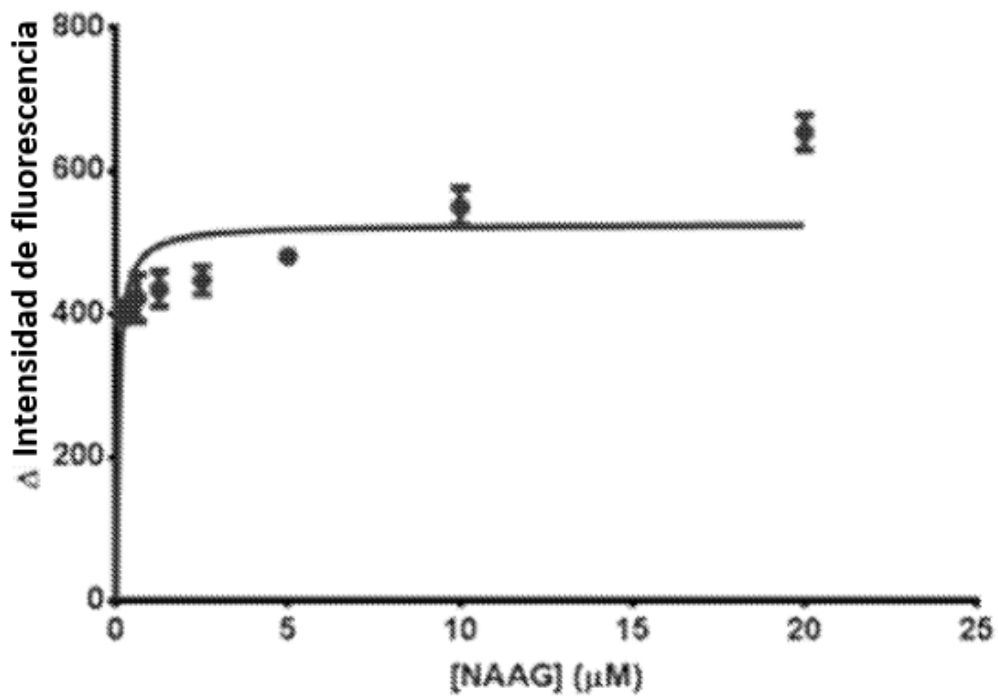


FIG. 17A

Células C4-2 (PSMA+), 24h

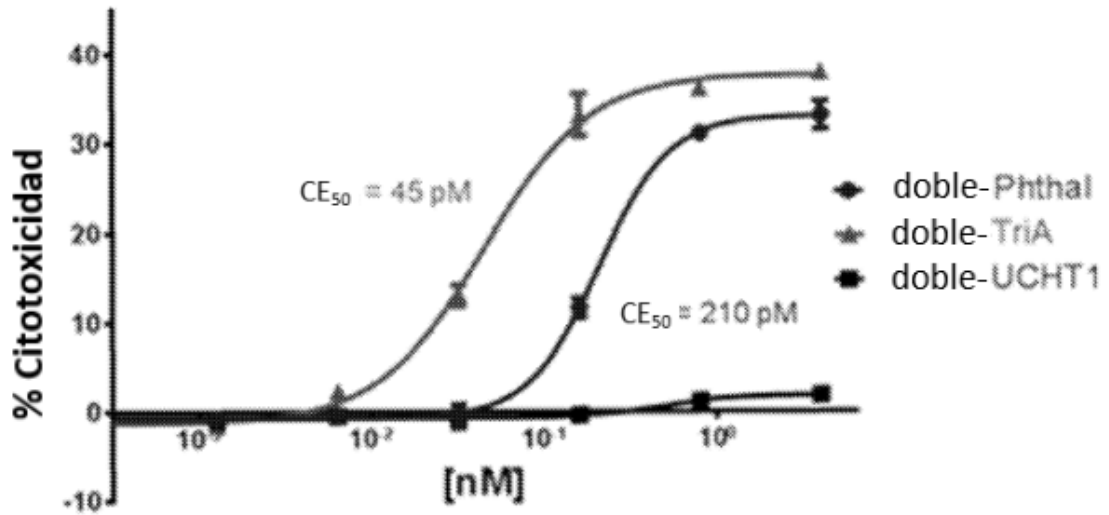


FIG. 17B

Células C4-2 (PSMA+), 48h

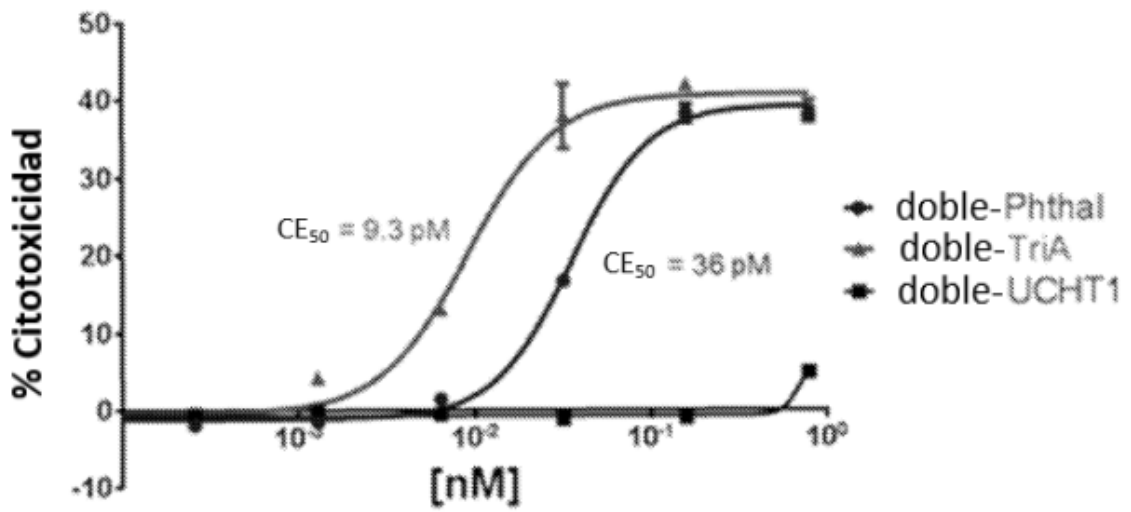


FIG. 18A

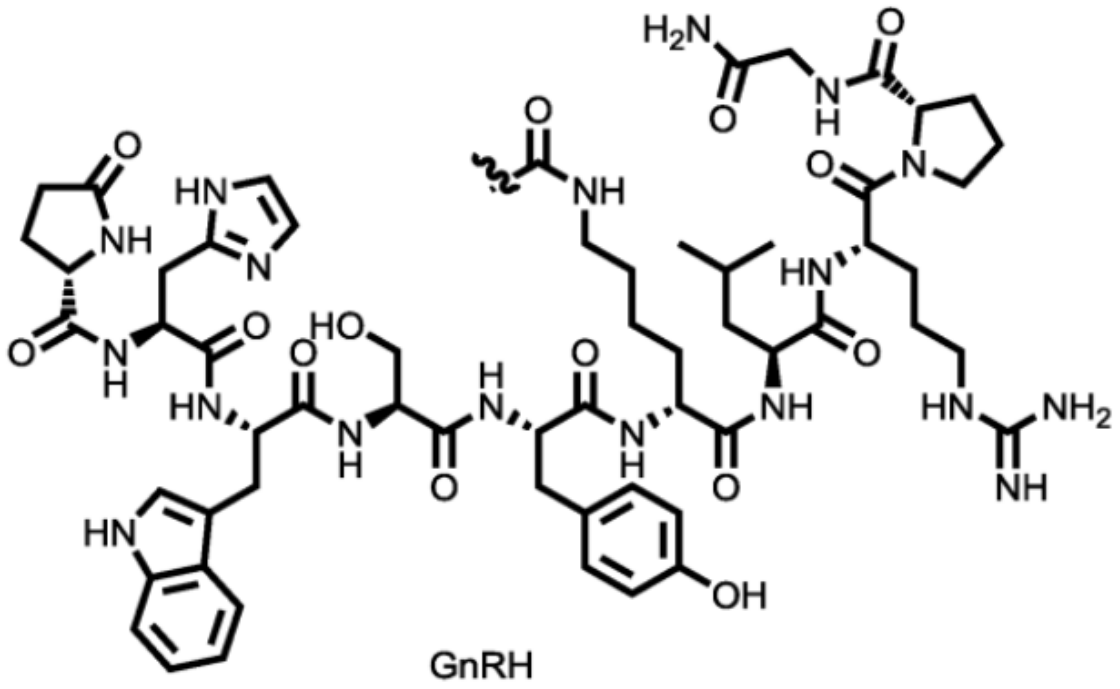


FIG. 18B

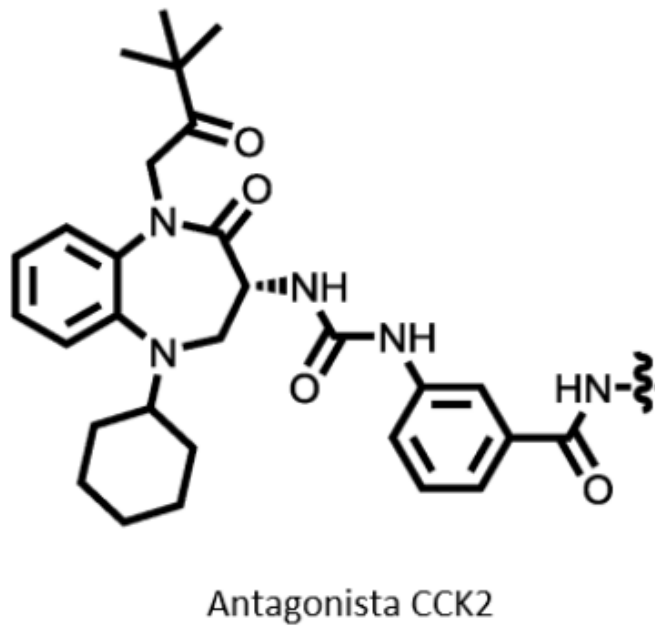
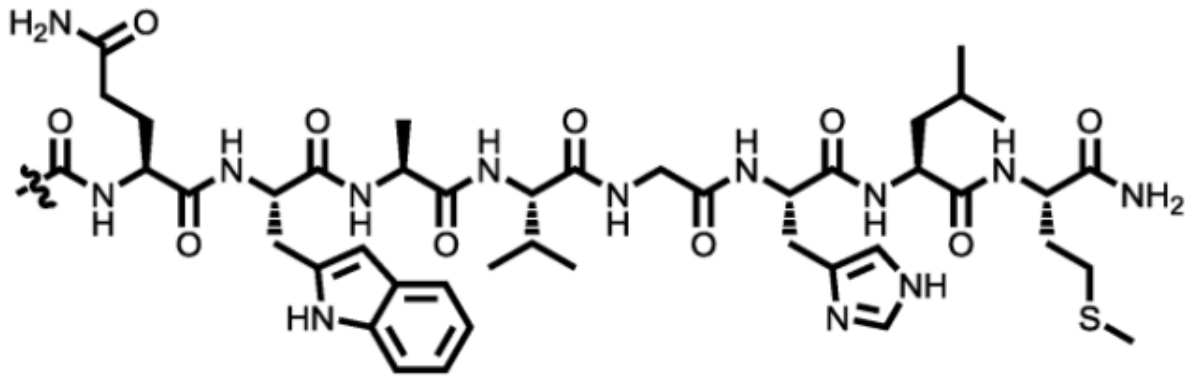
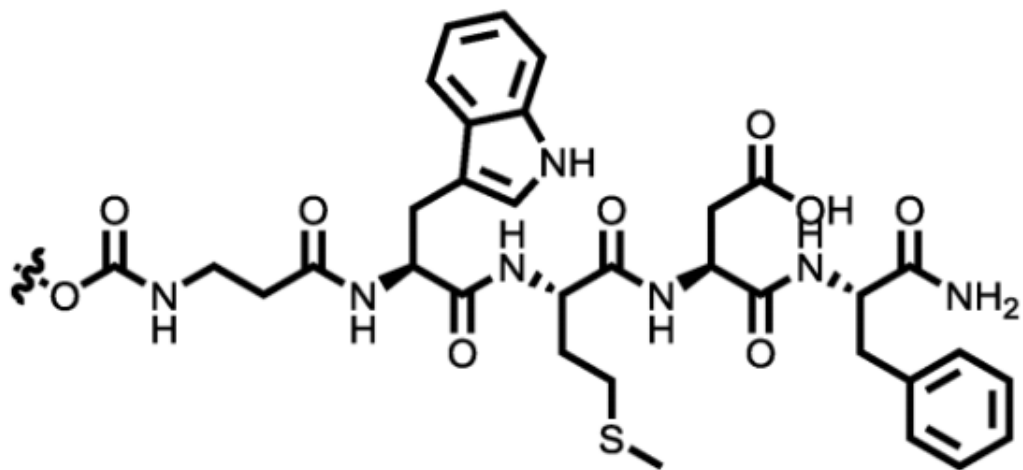


FIG. 18C



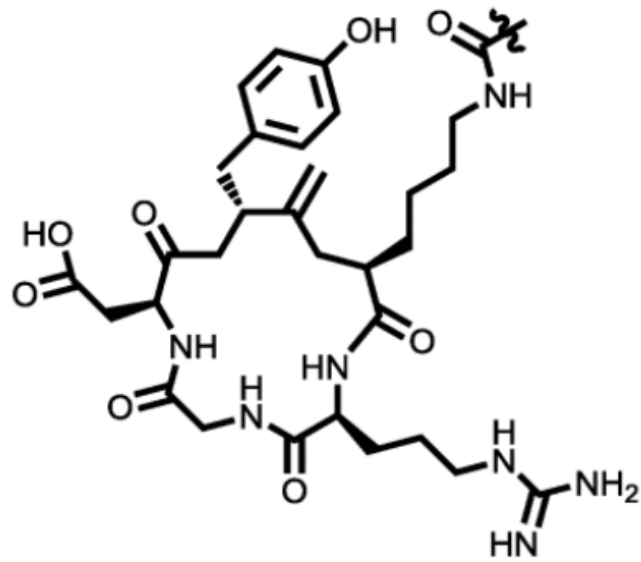
Bombesina

FIG. 18D



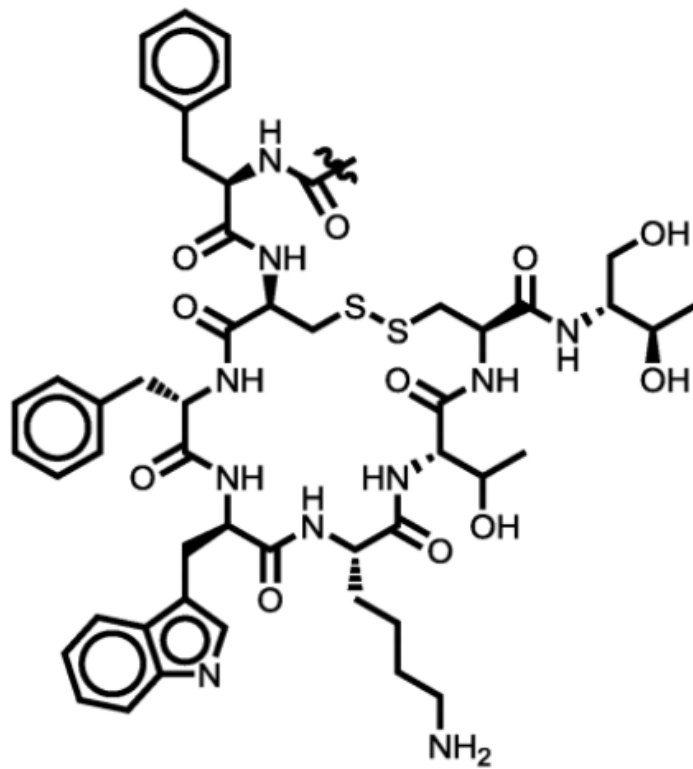
Pentagastrina

FIG. 18E



cRGD

FIG. 18F



Octreótido