(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 736 106**

(51) Int. CI.:

A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2016 PCT/US2016/020192**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16144608**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2016 E 16710382 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3268048**

(54) Título: **Anticuerpos que se pueden conjugar mediante la transglutaminasa y conjugados producidos a partir de ellos**

(30) Prioridad:

10.03.2015 US 201562130673 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2019

(73) Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

(72) Inventor/es:

RAO-NAIK, CHETANA y
DESHPANDE, SHRIKANT

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se pueden conjugar mediante la transglutaminasa y conjugados producidos a partir de ellos

Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos modificados de manera que se pueden conjugar con un resto farmacológico mediante la enzima transglutaminasa, y conjugados producidos a partir de dichos anticuerpos.

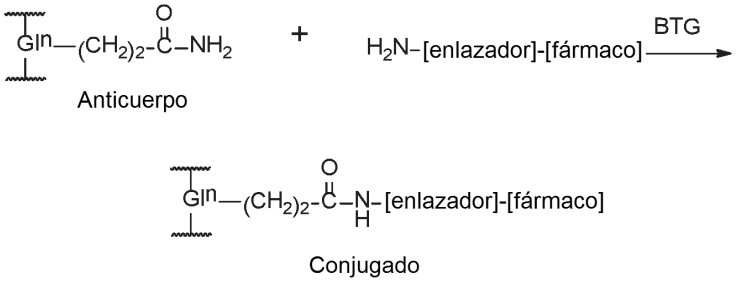
Antecedentes de la invención

Un tipo de agente anticáncer que ha atraído un fuerte interés actualmente es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) también conocido como un inmunoconjugado. En un ADC, se une covalentemente un agente terapéutico (fármaco) con un anticuerpo cuyo antígeno es expresado por una célula cancerosa. El anticuerpo, por medio de su unión al antígeno, sirve para suministrar el ADC en el cáncer. Una vez allí, la escisión del enlace covalente o la degradación del anticuerpo da como resultado la liberación del agente terapéutico en el sitio del cáncer. Por el contrario, mientras al ADC está circulando en el sistema sanguíneo, el agente terapéutico se mantiene inactivo debido a su enlace covalente con el anticuerpo. Por lo tanto, el agente terapéutico en un ADC puede ser mucho más potente (es decir, citotóxico) que los agentes quimioterápicos habituales debido a su liberación localizada. Por lo tanto, un ADC comprende tres componentes: (1) el anticuerpo, (2) un fármaco, y (3) un enlazador que une covalentemente el anticuerpo y el fármaco. Para una revisión de los ADN, véase Schrama et al. 2006.

Una etapa clave en la preparación de un ADC es la etapa de la unión covalente, a la que también se hace referencia como la etapa de conjugación. Se han desvelado muchos métodos para efectuar la conjugación. Uno que ha suscitado un interés sustancial recientemente es la conjugación mediada por transglutaminasa (TGasa), en particular la transglutaminasa bacteriana (BTG). Véase, por ejemplo, Jeger et al. 2010.

La BTG forma un enlace amida entre la cadena lateral carboxamida de la glutamina (el receptor de amina) y el grupo ε-amino de una lisina (el donante de amina). De manera específica, la transglutaminasa en selectiva con respecto al resto de glutamina, por ejemplo, necesitando que se localice en una parte flexible de un bucle proteico y esté flanqueado por aminoácidos particulares, pero es promiscua con respecto al resto de lisina, por ejemplo, aceptando fácilmente el grupo amino de un compuesto alquilenoamino como un equivalente del ε-amino de la lisina. Véase, Fontana et al. 2008.

En una conjugación mediada por BTG típica, el resto de glutamina se localiza en el anticuerpo, mientras que el grupo amino se localiza en el resto enlazador del fármaco, como se muestra a continuación:



En este esquema, el anticuerpo actúa como un receptor de amina y el resto H_2N-[enlazador]-[fármaco] actúa como un donante de amina.

La localización del resto de glutamina en una cadena polipeptídica tiene un gran efecto sobre su susceptibilidad para la transamidación mediada por BTG. Ninguno de los restos de glutamina de un anticuerpo son sustratos normalmente de BTG y son necesarias algunas modificaciones en el anticuerpo para inducir la susceptibilidad a la BTG. Normalmente, un anticuerpo está glicosilado en la asparagina 297 (N297) de la cadena pesada (glicosilación unida a N). Jeger et al. en 2010 descubrieron que la desglicosilación del anticuerpo, sea eliminando el sitio de glicosilación mediante una sustitución N297A o por desglicosilación enzimática tras la traducción, da lugar a una glutamina 295 (Q295) cercana y susceptible a la BTG. También demostraron que una sustitución N297Q no solo elimina la glicosilación, sino que también introduce un segundo resto de glutamina (en la posición 297) que también es un receptor de amina. Por lo tanto, una simple desglicosilación genera dos restos de glutamina reactivos frente a BTG por anticuerpo (uno por cada cadena pesada, en Q295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro restos de glutamina reactivos a la BTG (dos por cada cadena pesada, en las posiciones Q295 y Q297).

Las divulgaciones relacionadas con la preparación de ADN mediada por transglutaminasa incluyen: Dennler et al.

2014, Innate Pharma 2013, Jeger et al. 2010, Pons et al. 2013, y Strop et al., 2013.

En particular, Pons et al. 2013 desvelan la modificación de un anticuerpo con un marcador que contiene cuatro aminoácidos de glutamina, que se puede localizar en el extremo C de una de sus cadenas, para hacerlo reactivo a la transglutaminasa (también se ha desvelado la unión de marcadores o extensiones en el extremo C de una cadena de anticuerpo en otros contextos, véase, por ejemplo, Liu et al. 2014).

Otras divulgaciones de transglutaminasa, más relativas en general, al marcado o modificación de proteínas (incluyendo anticuerpos), incluyen: Bregeon 2014, Bregeon et al. 2013 y 2014, Chen et al. 2005, Fischer et al. 2014, Kamiya et al. 2011, Lin et al. 2006, Mero et al. 2009, Mindt et al. 2008, Sato 2002, Sato et al. 2001, y Sugimura et al. 2007. WO 2012/059882 A2 desvela conjugados de polipéptidos que contienen Fc modificado que comprende un marcador que contiene una glutamina donante de acilo.

Todas las citas de documentos citados en el presente documento por su primer autor o inventor y año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva.

Sumario de la invención

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de longitud completa que se ha modificado introduciendo restos de glutamina que son sustratos para la transglutaminasa, especialmente para la BTG, modificando el extremo C de al menos una de sus cadenas pesadas añadiendo a este una extensión que contiene al menos una glutamina que es un sustrato para la transglutaminasa. La extensión tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3), EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6), o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2).

Preferentemente, la extensión tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3).

Los inventores también han descubierto que las variantes recortadas o protegidas de algunas extensiones del extremo C también tienen glutaminas reactivas. Dichas variantes recortadas se ejemplifican por EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6), o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2). Parece que las secuencias recortadas necesitan presente una serina (aminoácido 6 de la SEQ ID NO: 2) con el fin de que la glutamina sea reactiva.

En otra realización, se proporciona un método de producción de un conjugado anticuerpo-fármaco, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo de longitud completa, en el que al menos una de cuyas cadenas pesadas tiene una extensión del extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3);
(b) proporcionar un donante de amina de fórmula

$$NH_2\text{-}X\text{-}D,$$

en el que D representa un fármaco y X representa un grupo enlazador bivalente que conecta el fármaco D y el grupo amino NH_2.
(c) poner en contacto el anticuerpo y el donante de amina en presencia de transglutaminasa; y
(d) permitir que el anticuerpo y el donante de amina formen el conjugado anticuerpo-fármaco mediante la formación de un enlace amida entre una glutamina de la extensión del extremo C y el grupo amino NH_2 del resto donante de amina.

La presente invención proporciona adicionalmente otro método de producción del conjugado anticuerpo-fármaco, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo de longitud completa, en el que el anticuerpo se ha modificado añadiendo al menos a una de sus cadenas pesadas una extensión del extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3);
(b) proporcionar un donante de amina de fórmula

$$NH_2\text{-}X^1\text{-}R^1,$$

en la que R^1 representa un primer grupo funcional reactivo que es un grupo azida, un grupo dibenzoazaciclooctina, un grupo maleimida, un grupo tiol, un grupo hidroxilamina, o un grupo cetona, y X^1

representa un enlazador bivalente que conecta el grupo funcional reactivo R^1 y un grupo amino NH_2.
(c) poner en contacto el anticuerpo y el donante de amina en presencia de transglutaminasa;
(d) permitir que el anticuerpo y el donante de amina formen un anticuerpo modificado que tiene unido al mismo un primer grupo funcional reactivo R^1, mediante la formación de un enlace amida entre una glutamina de la extensión del extremo C y el grupo amino NH_2 del donante de amina;
(e) poner en contacto el anticuerpo modificado con un fármaco que contenga el resto de fórmula

$$R^2\text{-}X\text{-}D,$$

en la que R^2 es un segundo grupo funcional reactivo que reacciona covalentemente con el primer grupo funcional reactivo R^1, D es un fármaco, y X es un enlazador bivalente que conecta el fármaco D y el segundo grupo funcional reactivo R^2; en el que R^2 es un grupo dibenzoazaciclooctina cuando R^1 es un grupo azida, R^2 es un grupo azida cuando R^1 es un grupo dibenzoazaciclooctina, R^2 es un grupo tiol cuando R^1 es un grupo maleimida, R^2 es un grupo maleimida cuando R^1 es un grupo tiol, R^2 es un grupo cetona cuando R^1 es un grupo hidroxilamina, o R^2 es un grupo hidroxilamina cuando R^1 es un grupo cetona; y

(f) permitir que el primer y segundo grupos funcionales reactivos R^1 y R^2 reaccionen para formar el conjugado anticuerpo-fármaco.

En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un resto del fármaco mediante un enlace amida en la cadena lateral de un resto de glutamina en una extensión del extremo C de una cadena pesada del anticuerpo, teniendo la extensión del extremo C una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD70 o anti-mesotelina. Preferentemente, el resto del fármaco es un enlazador de agrupamiento menor de ADN (especialmente que también alquile el ADN mediante su unión) o un análogo de tubulisina.

Breve descripción de los dibujos

Las **Fig. 1a** y **1b** muestran, en combinación, un esquema para la síntesis del donante de amina (A).

La **Fig. 2** muestra la actividad de un conjugado, producido por el procedimiento de conjugación de una etapa.

La **Fig. 3** compara las actividades de dos conjugados producidos mediante el procedimiento de conjugación de dos etapas.

Descripción de las reivindicaciones

Los anticuerpos del isotipo IgG1 contienen en su región constante de la cadena pesada, en las posiciones 297-300, la secuencia de aminoácidos EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3, con la numeración EU como en Kabat). Como se ha expuesto anteriormente, el resto de glutamina Q295 no es un sustrato de transglutaminasa a menos de que esté ausente el grupo glicósido unido normalmente en la posición 297, sea por retirada enzimática o produciendo por modificación genética una sustitución de N297 para evitar la formación del enlace de glicósido unido a N.

Los inventores han descubierto que si la secuencia EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3), está unida a un extremo C de una cadena pesada de un anticuerpo como una extensión del mismo, el resto de glutamina es un sustrato para la transglutaminasa, haciendo que el anticuerpo modificado de esta manera sea susceptible de la conjugación mediada por transglutaminasa. Además, los inventores han descubierto que las variantes de esta secuencia EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) y EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) son eficaces de manera similar. En la última, se ha descubierto que ambos restos de glutamina son reactivos a la transglutaminasa.

Se hace referencia al número de restos del fármaco unidos al anticuerpo en un ADC como la relación fármaco-anticuerpo, o DAR. En el caso de un anticuerpo en el que cada cadena pesada tiene una extensión en el extremo C que tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3), la DAR máxima teórica es 2, con un resto del fármaco unido a cada cadena pesada. En el caso de un anticuerpo en el que cada cadena pesada tiene una extensión del extremo C que tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), la DAR teórica es 4, con un resto del fármaco unido a cada resto de glutamina de cada una de las extensiones. Los expertos en la técnica apreciarán que la reacción de conjugación no siempre es un 100 % eficaz, y que se puede obtener un número menor para una preparación de ADC determinada, por ejemplo, una DAR medida de 1,7 cuando el máximo teórico es 2, o una DAR medida de 3,5 cuando el máximo teórico es 4.

Preferentemente, el anticuerpo que se utiliza en la presente invención es un anticuerpo de longitud completa que tiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas (kappa o lambda). Preferentemente, ambas cadenas pesadas tienen una extensión del extremo C de acuerdo con la invención Preferentemente, el anticuerpo es del isotipo IgG1. Más preferentemente, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada que es una

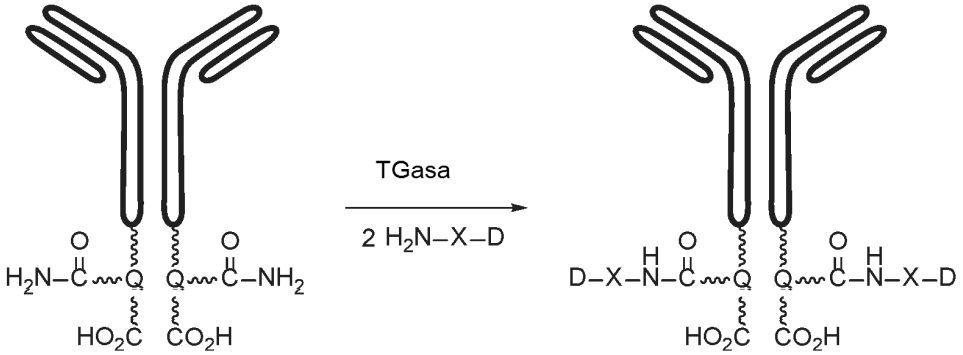
variante de la IgG1 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4. Esta variante tiene el alotipo R214/E356/M358 y opcionalmente tiene el extremo C K447 recortado después de la traducción (según la numeración por EU como en Kabat). El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo monoclonal, más preferentemente, un anticuerpo monoclonal humano.

Los inventores han descubierto que cuando el anticuerpo tiene una lisina en el extremo C, tal como ocurre en los anticuerpos nativos, la lisina puede actuar como un donante de amina y entrecruzarse con las cadenas pesadas del anticuerpo. Por lo tanto, puede ser deseable escindir la lisina del extremo C. También, cuando se produce un anticuerpo de manera recombinante, algunos de los restos de lisina de la cadena del extremo C de cadena pesada (aminoácido 47 en la **FIG. 2**) a menudo se retiran durante las etapas de expresión o purificación mediante las enzimas de la célula huésped de producción, dando lugar a un producto heterogéneo (con ambas lisinas presentes, una lisina retirada, o ambas lisinas retiradas). Esta heterogeneidad es indeseable. Para obtener un producto más homogéneo, ambas lisinas se pueden retirar intencionadamente, sea mediante un tratamiento enzimático adicional del producto inicial o eliminando el codón de la lisina del extremo C de la secuencia de nucleótidos utilizada para la expresión recombinante. McDonough et al. 1992. Las variantes de anticuerpo con las sustituciones de cisteína desveladas en el presente documento que carecen de restos de lisina en el extremo C de la cadena pesada también están dentro del alcance de la presente invención. Las variantes de anticuerpo en las que se han eliminado tanto la glicina como la lisina del extremo C también se conocen y se incluyen en el alcance de la presente invención.

Una transglutaminasa preferida para su uso en la presente invención es una BTG de *Streptomyces mobaraensis*, que está disponible en el mercado y se puede preparar de manera recombinante.

Los anticuerpos que tienen la extensión del extremo C de la presente invención se pueden conjugar mediante un procedimiento en una o dos etapas.

Esquemáticamente, una conjugación en una etapa se puede representar de la siguiente manera, utilizando, a modo de ilustración, un anticuerpo con extensiones del extremo C que tienen una glutamina (es decir, de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 o NO: 3).

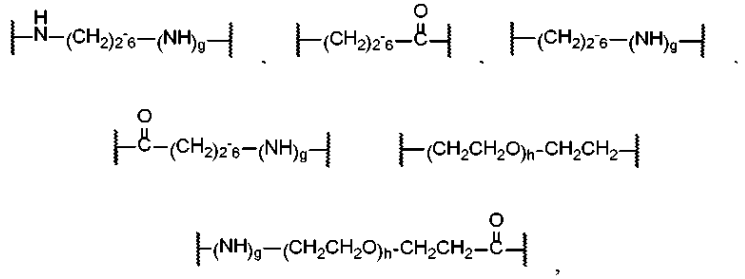


El donante de amina se puede representar por la fórmula (I)

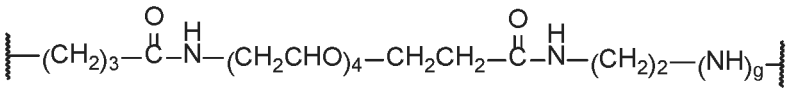
$H_2N\text{-}X\text{-}D$ (I)

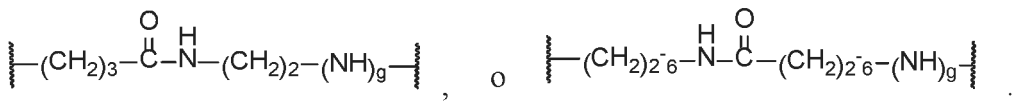
donde D es un fármaco y X es un enlazador bivalente que conecta el fármaco D y el grupo amino H_2N reactivo con la transglutaminasa.

El enlazador X puede comprender cadenas de alquileno y cadenas de polietilenglicol solas o en combinación, como se ilustra a continuación:



y combinaciones de las mismas, en el que el subíndice g es 0 o 1 y el subíndice h es de 1 a 24, preferentemente de 2 a 4. Estos segmentos se pueden combinar, tal como se ilustra a continuación:

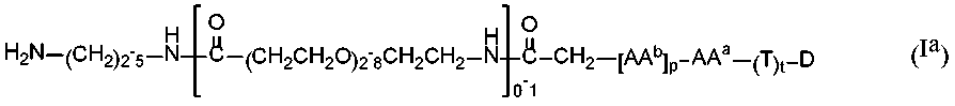




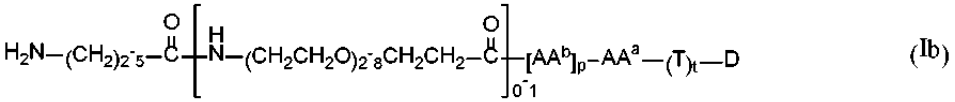
El enlazador X puede contener también un grupo escindible, para la liberación del fármaco D del conjugado después de alcanzar el sitio diana. Ejemplos de grupos escindibles incluyen disulfuros (escisión mediante intercambio de disulfuros), hidrazonas (escisión a pH bajo), y péptidos (escisión enzimática). De manera alternativa, si no está presente un grupo escindible, la liberación del fármaco D del conjugado puede producirse mediante catabolismo del anticuerpo.

También, el enlazador X contiene un grupo auto-inmolante, como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento.

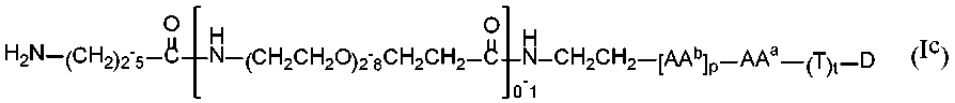
Las realizaciones preferidas del resto donante de amina (I), que tiene un péptido escindible, se representan por la fórmula (Ia) a (Ic):



(Ia)



(Ib)



(Ic)

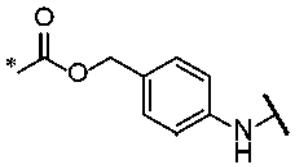
en las que

D es un fármaco;
AA^a y cada uno de AA^b se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;
p es 1, 2, 3, o 4;
T es un grupo auto-inmolante; y
t es 0 o 1.

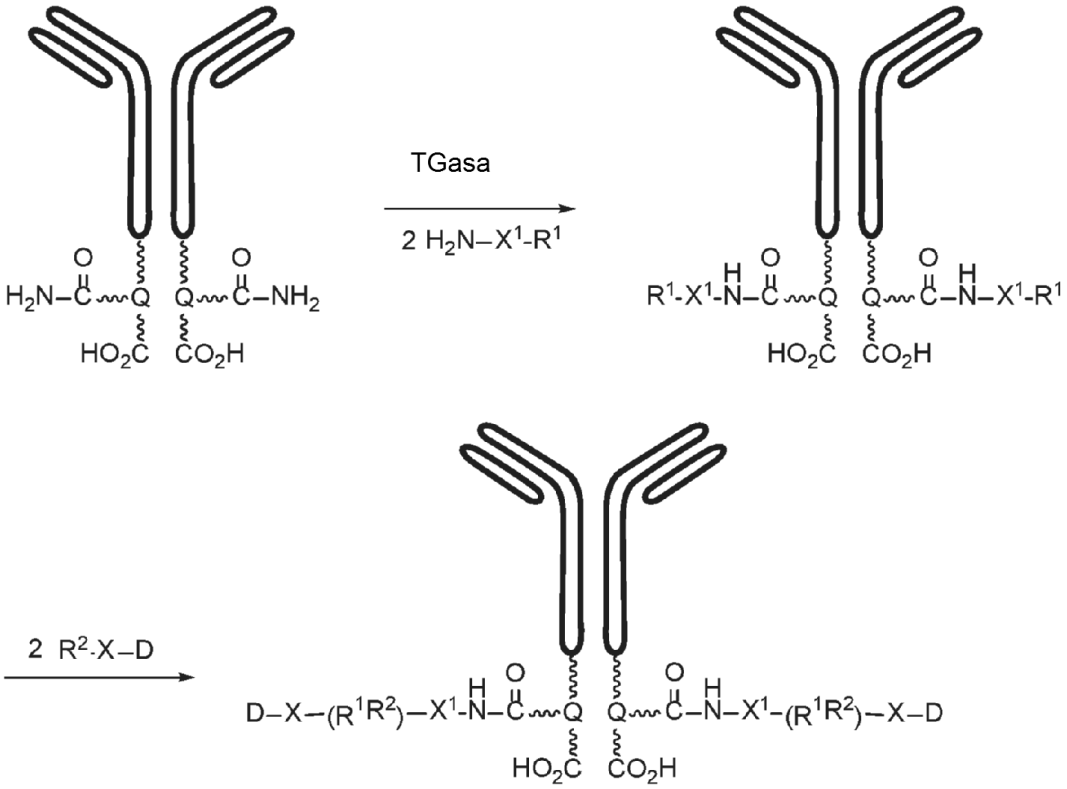
En las fórmulas (Ia), (Ib), y (Ic), $-AA^a-[AA^b]_p-$ representa un polipéptido cuya longitud se determina por el valor de p (dipéptido si p es 1, tetrapéptido si p es 3, etc.). AA^a está en el extremo carboxilo del polipéptido. Por el contrario, el último AA^b está en el extremo amino del polipéptido. Los polipéptidos $-AA^a-[AA^b]_p-$ preferidos son Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln, y Asp-Val-Cit, escritos en la dirección convencional de N a C, como en H_2N-Val-Cit-CO_2H). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys, o Val-Ala. Preferentemente, un polipéptido $-AA^a-[AA^b]_p-$ es escindible por una enzima que se encuentra dentro de la célula diana (cancerosa), por ejemplo, una catepsina y especialmente la catepsina B.

Como se indica por el subíndice t igual a 0 o 1, un grupo auto-inmolante T está presente opcionalmente en los donantes de amina (Ia), (Ib) y (Ic). Cuando está presente, un grupo auto-inmolante proporciona una separación especial entre el fármaco D y el polipéptido, para evitar que el fármaco D interfiera de manera estérica con una escisión enzimática del polipéptido para liberar el fármaco. El grupo auto-inmolante T preferentemente es un grupo p-aminobencil oxicarbonilo (PABC), cuya estructura se muestra a continuación, señalando con un asterisco (*) el

final del PABC unido a un nitrógeno de amina del fármaco D y una línea ondulante (〰) que señala el extremo unido al polipéptido -AA^a-$[AA^b]_p$-.

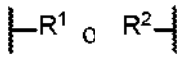
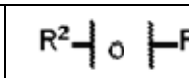
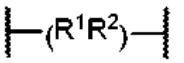
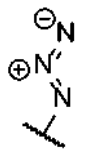
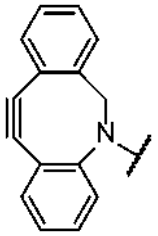
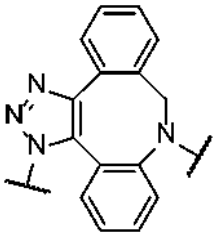
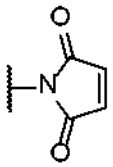
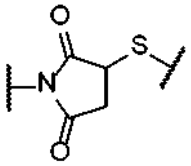
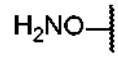
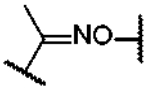


Esquemáticamente, el procedimiento de dos etapas se puede representar de la siguiente manera, utilizando de nuevo a modo de ilustración un anticuerpo que tiene extensiones en el extremo C que tienen cada una glutamina:



En este esquema, X^1 y X son enlazadores, D es el resto del fármaco, y R^1 y R^2 son grupos funcionales reactivos complementarios que reaccionan covalentemente entre ellos para formar (R^1R^2), completando la formación del ADC. Los componentes del enlazador X se han descrito anteriormente en el contexto del procedimiento de una etapa. El enlazador X^1 puede comprender cadenas de alquileno y poli(etilenglicol), como se ha descrito anteriormente para el enlazador X.

Ejemplos de emparejamientos de los grupos funcionales reactivos R^1 y R^2 y su producto de reacción (R^1R^2) se muestran en la Tabla I a continuación.

Tabla I - Grupos R^1 y R^2 y su producto de reacción		
		
		
		
		

Por lo tanto, se contemplan los siguientes emparejamientos de los grupos funcionales reactivos R^1 y R^2 de la Tabla I:

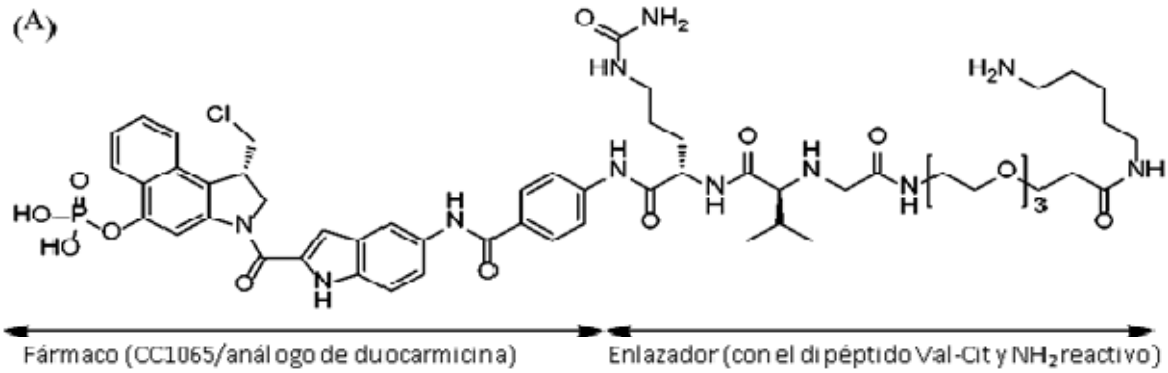
(a) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo azida y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo dibenzoazaciclooctina;
(b) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo dibenzoazaciclooctina y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo azida;
(c) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo maleimida y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo tiol;
(d) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo tiol y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo maleimida;
(e) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo cetona y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo hidroxilamina;
(f) el primer grupo funcional reactivo R^1 es un grupo hidroxilamina y el segundo grupo funcional R^2 es un grupo cetona.

Como los ADC se utilizan normalmente en el tratamiento del cáncer, el fármaco es preferentemente un fármaco citotóxico que produce la muerte de la célula direccionada. Los fármacos citotóxicos que se pueden utilizar en ADC incluyen los siguientes tipos de compuestos y sus análogos y derivados:

(a) enedinas tales como caliqueamicina (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464 y 3466) y uncialamicina (véase, por ejemplo, Davies et al., documento WO 2007/038868 A2 (2007) y Chowdari et al., documento US 8.709.431 B2 (2012));
(b) tubulisinas (véase, por ejemplo, Domling et al., documento US 7.778.814 B2 (2010); Cheng et al., US 8.394.922 B2 (2013); y Cong et al., documento US 2014/0227295 A1 (2014);
(c) unidores/alquilantes de agrupamientos menores de ADN, tales como CC-1065 y duocarmicina (véase, por ejemplo, Boger, US 6.5458.530 B1 (2003); Sufi et al., US 8.461.117 B2 (2013); y Zhang et al., US 2012/0301490 A1 (2012));
(d) epotilones (véase, por ejemplo, Vite et al., documento US 2007/0275904 A1 (2007) y documento US RE42930 E (2011));
(e) auristatina (véase, por ejemplo, Senter et al., US 6.844.869 B2 (2005) y Doronina et al., documento US 7.498.298 B2 (2009));
(f) dímeros de pirrolobenzodiacepina (PBD) (véase, por ejemplo, Howard et al., documento US 2013/0059800 A1(2013); documento US 2013/0028919 A1 (2013); y documento WO 2013/041606 A1 (2013)); y
(g) maitansinoides tales como DM1 y DM4 (véase, por ejemplo, Chari et al., documento US 5.208.020 (1993) y Amphlett et al., documento US 7.374.762 B2 (2008)).

Por lo tanto, el resto del fármaco D puede ser una enedina, una tubulisina, un unidor/alquilante de agrupamientos menores de ADN, una epotilona, una auristatina, una pirrolobenzodiacepina, o un maitansinoide, o un análogo o derivado de los mismos. Un resto de fármaco D preferido es un unidor/alquilante del agrupamiento menor de ADN.

Un donante de amina a modo de ejemplo diseñado para utilizarse en el procedimiento de conjugación de una etapa se muestra a continuación:



En un compuesto (A) el fármaco es un CC-1065/análogo de duocarmicina, que se une al agrupamiento menor de ADN y entonces alquila el ADN. El enlazador contiene un dipéptido valina-citrulina (Val-Cit), que es un sustrato para la enzima lisosómica catepsina B, haciendo posible la escisión del enlazador para liberar el fármaco del ADC.

La práctica de la presente invención se puede entender adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración.

Ejemplo 1 – Anticuerpos con extensiones en el extremo C

Se modificó un vector de expresión para la cadena pesada del anticuerpo anti-CD70 1F4 (Coccia et al. 2010) remplazando la secuencia de nucleótido original que codifica la región constante de la cadena pesada con uno modificado que incluyen una extensión EEQYASTYR en el extremo C (SEC ID NO: 5). El vector de expresión modificado de esta manera se co-transfectó junto con un vector de expresión para la cadena ligera (kappa) 1F4 en células CHO-S. Los clones estables se seleccionaron en cuanto a la producción del anticuerpo 1F4 que tenía la región constante de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, que a su vez da lugar a un anticuerpo 1F4 que tiene una extensión EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) en el extremo C después de cortarse la arginina terminal tras la traducción (“anti-CD70-a”).

De manera análoga, se utilizó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 para producir un anticuerpo 1F4 con una región constante de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, que da lugar a un anticuerpo 1F4 con una extensión EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) después del corte tras la traducción de la arginina terminal (“anti-CD70-b”).

Se preparó de manera similar el anticuerpo 6A4 anti-mesotelina (Terret et al. 2012) que tenía o una extensión EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) o EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) en el extremo C de la cadena pesada, *mutatis mutandis*.

Ejemplo 2 – Conjugación mediada por transglutaminasa

Los procedimientos representativos para la conjugación mediante métodos de una etapa y dos etapas se describen a continuación.

Método 1 (Procedimiento de una etapa): Se hizo reaccionar el anticuerpo, a ~ 2 mg/ml, en 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, con un exceso de 10 veces molares por sitio de donante de amina en presencia de 3 Unidades de transglutaminasa bacteriana recombinante por mg de anticuerpo. Se permitió que la reacción progresara durante 5 h a 37 ºC con un mezclado suave continuo.

El conjugado se filtró en 0,2 mm antes de la purificación cromatográfica por intercambio catiónico. Se regeneró una columna de intercambio catiónico (CEX) SP Sepharose de Altas prestaciones con 5 VC (volúmenes de columna) de 50 mM de HEPES, 5 mM de Glicina, 1 M de NaCl, pH 5,5 (Tampón B). A continuación de la regeneración, la columna se equilibró con 3 VC de tampón de equilibrado, 50 mM de HEPES, 5 mM de Glicina, pH 5,5 (Tampón A). El conjugado se cargó y se lavó la columna una vez con el tampón de equilibrado. El conjugado se eluyó con un gradiente lineal desde 0-100 % de B sobre 6 VC. El eluído se recolectó en fracciones y se analizó por SDS-PAGE y análisis de Western.

Método 2 (Procedimiento de dos etapas): El anticuerpo que tenía una extensión en el extremo C, a ~2 mg/ml, en PBS, pH 7,4, se hizo reaccionar con un exceso de 20 veces molar por glutamina reactiva a transglutaminasa con O-(2-aminoetil-O’-(2-azidoetil))pentaetilenglicol (Sigma Aldrich) en presencia de 3 Unidades de transglutaminasa bacteriana recombinante por mg de anticuerpo, durante una noche a 37 ºC con mezclado suave continuo.

El anticuerpo modificado con azido (azido-mAb) se purificó utilizando una columna SuRe mAbSelect (GE Healthcare) y entonces se cargó en una columna pre-equilibrada con 1x PBS, pH 8,0. El azido-mAb se eluyó de la columna con 25 mM de glicina, 10 mM de ácido succínico, pH 5,0. El eluído se recolectó en fracciones y se analizó por SDS-PAGE.

El azido-mAb A se dializó en PBS, pH 7,4 y se concentró a 4 mg/ml. El azido-mAb se hizo reaccionar con un compuesto enlazador de fármaco que tenía un grupo dibenzociclooctina (DIBO) con un exceso de 5x por grupo azida. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 h. El conjugado se filtró a 0,2 mm y se hizo un intercambio de tampón a un tampón de formulación (con un volumen de 6x) (20 mg/ml de sorbitol, 10 mg/ml de glicina, pH 5,0). El volumen formulado se filtró mediante un filtro PES de 0,2 mm en tubos estériles y se almacenó a -80 ºC.

Los expertos en la técnica apreciarán que el procedimiento de dos etapas se ilustró con azida y DIBO como grupos funcionales reactivos complementarios, pero se pueden utilizar otros grupos funcionales reactivos complementarios, *mutatis mutandis*.

Ejemplo 3 – Síntesis de un donante de amina (A)

Compuesto **3**. A una solución de ácido 4-nitrobenzoico **1** (Aldrich, 2,36 g, 14,12 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se añadió carbonato potásico (1,952 g, 14,12 mmol) seguido por (bromometil)benceno **2** (Aldrich 1,848 ml, 15,53 mmol) en agua. Después de agitar a 60 ºC durante una noche, se enfrió la reacción a temperatura ambiente (TA) y se concentró para retirar el acetonitrilo. El sólido blanco resultante se disolvió en 100 ml de agua y 50 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró al vacío. El resto se suspendió en tolueno (2 x 8 ml) y se concentró al vacío para dar el 4-nitrobenzoato de bencilo bruto **3** (**3**, 3,86 g, 15,01 mmol, 106 % de rendimiento) como un sólido blanco. 1HNMR ($CDCl_3$) δ 8.26(m, 4H), 7.44(m, 5H), 5.42(s, 2H).

Compuesto **4**. A una solución de 4-nitrobenzoato de bencilo (3, 3,76 g, 14,62 mmol) en acetona (40 ml) a 0 ºC se añadió polvo de zinc (4,78 g, 73,1 mmol) seguido por una solución de cloruro amónico (7,82 g, 146 mmol) en agua. Después del agitado a TA durante 1 h, la reacción se filtró a través de un medio de filtro CELITE™ y se concentró al vacío. El resto se suspendió en acetato de etilo, se lavó con agua seguido por salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró al vacío. El resto se purificó por cromatografía flash utilizando una columna Isco de 80 g con un 0-50 % de acetato de etilo/hexanos para dar 4-aminobenzoato de bencilo **4** (2,93 g, 12,89 mmol, 88 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^{1}HNMR ($CDCl_3$) δ 7.91(d, 2H), 7.30-7.41(m, 5H), 6.65(d, 2H), 5.33(s, 2H), 4.12(s, 2H); MS(ESI) m/z 228 $(M+H)^+$.

Compuesto **6**. Se cargó un matraz de 200 ml con 4-aminobenzoato de bencilo **4** (3,6 g, 15,84 mmol), ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-ureidopentanoico **5** (Chem-Impex, 5,25 g, 13,20 mmol), HOBt hidrato (Aldrich, 3,03 g, 19,80 mmol), y EDC (ACT, 3,54 g, 18,48 mmol). El matraz se purgó con nitrógeno y se añadió diclorometano (DCM, 20 ml) seguido por DMF (5 ml). Entonces se añadió cloruro de cobre (II) (Aldrich, 2,130 g, 15,84 mmol) para dar una solución homogénea marrón oscura. Después de agitar a TA durante 4 h, se añadió un lo mismo de HOBt y EDC. Se continuó con el agitado a TA durante una noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el resto se dividió en dos lotes que se purificaron por separado mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 120 g eluyéndola con un 0-10 % de metanol/DCM. El producto así obtenido se disolvió en THF mínimo, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío. El sólido resultante se trituró con acetato de etilo para dar el compuesto **6** (3,34 g, 5,51 mmol, un 41,7 % de rendimiento) como un sólido amarillo. MS(ESI) m/z 607 $(M+H)^+$.

Compuesto **7**. A una solución de compuesto **6** (3,34 g, 5,51 mmol) en THF (20 ml) a TA se añadió piperidina (2,73 ml, 27,5 mmol). Después del agitado a TA durante 60 min, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 80 g eluyéndola con un 0-20 % de metanol/DCM para dar el compuesto **7** (2,24 g, 5,83 mmol, un 106 % de rendimiento) como un sólido blanco. MS(ESI) m/z 385 $(M+H)^+$.

Compuesto **9**. Se cargó un matraz de 50 ml con el compuesto **7** (268 mg, 0,697 mmol), compuesto **8** (TCI, 355 mg, 1,046 mmol), y EDC (ACT, 200 mg, 1,046 mmol). El matraz se purgó con nitrógeno y se añadieron DCM (5 ml) seguido por DMF (1 ml). Después del agitado a TA durante 1 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción había solidificado. La mezcla de reacción se concentró para retirar el DCM, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, un 10 % de solución acuosa de cloruro de litio, y luego con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico de nuevo. La capa orgánica se filtró entonces para dar el compuesto **9** en bruto (443 mg, 0,628 mmol, un 90 % de rendimiento) que había precipitado como un sólido blanco. MS(ESI) m/z 706 $(M+H)^+$.

Compuesto **10**. A una solución del compuesto **9** (0,44 g, 0,623 mmol) en THF (5 ml) a TA se añadió piperidina (Aldrich, 0,309 ml, 3,12 mmol). Después de agitarlo a TA durante 60 min, la mezcla de reacción había solidificado y

se añadieron otros 5 ml de THF. Después del agitado a TA durante 2 h adicionales, la reacción se concentró al vacío. El resto se suspendió en un 10 % de metanol/DCM y se filtró para dar el compuesto 10 en bruto (245 mg, 0,507 mmol, un 81 % de rendimiento). El filtrado se concentró al vacío y el resto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 40 g eluyéndola con un 0-20 % de metanol/DCM para dar el compuesto **10** (65 mg, 0,132 mmol, un 21 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^{1}HNMR (DMSO) δ 7,7-8,1(m, 5H), 7,30-7,49(m, 5H), 5,58(s, 1H), 5,34(s, 2H), 4,32(t, 1H), 3,61(s, 1H), 2,98(m, 2H), 1,62-1,93(m, 3H), 1,43(m, 2H), 0,92 (dd, 6H); MS(ESI) m/z 484 $(M+H)^+$.

Compuesto **12**. A una solución del compuesto **11** (Aldrich, 1,5 g, 5,41 mmol) en DCM (20 ml) a 0 ºC se añadió DIPEA (Aldrich, 1,889 ml, 10,82 mmol) y luego cloruro de 2-bromoacetilo (Aldrich, 0,495 ml, 5,95 mmol). Después del agitado a 0 ºC durante 10 min, el baño de enfriamiento se retiró y se agitó continuamente a TA durante 1 h, La mezcla de reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos agrupados se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío. El resto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 40 g eluyéndola con un 0-70 % de acetato de etilo/hexanos para dar el compuesto **12** (1,15 g, 2,89 mmol, un 53,4 % de rendimiento) como un aceite naranja. ^{1}HNMR ($CDCl_3$) 7,00(b, 1H), 3,91(s, 2H), 3,50-3,71(m, 14H), 2,54(t, 2H), 1,46(s, 9H).

Compuesto **13**. Una mezcla del compuesto **10** (300 mg, 0,620 mmol), compuesto **12** (297 mg, 0,744 mmol), yoduro potásico (Aldrich, 103 mg, 0,620 mmol) y DIPEA (Aldrich, 0,217 ml, 1,241 mmol) en DMF (3 ml) se agitó a 40 ºC durante 6 h. Después del enfriamiento a TA, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, un 10 % de cloruro de litio acuoso, y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El resto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 40 g eluyéndola con un 0-10 % de metanol/DCM para dar el compuesto **13** (336 mg, 0,420 mmol, un 67,6 % de rendimiento) como un aceite amarillo. MS(ESI) m/z 801 $(M+H)^+$.

Compuesto **14**. A una solución del compuesto **13** (0,33 g, 0,412 mmol) en dioxano (5 ml) se añadió HCl 4 N en dioxano (10 ml). Después de agitar a TA durante 1 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío para dar el producto **14** en bruto como un aceite transparente viscoso que se utiliza directamente sin purificación.

Compuesto **15**. Se cargó un matraz de 50 ml con el compuesto **14** (307 mg, 0,412 mmol), tert-butil(2-aminopentanil) carbamato (Chem-Impex, 100 mg, 0,494 mmol), y BOP (Chem-Impex, 237 mg, 0,536 mmol). El matraz se purgó con nitrógeno y se añadieron DMF (2 ml) y DIPEA (0,180 ml, 1,030 mmol). Después de agitarlo a TA durante 1 h, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo, y se lavó sucesivamente con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, un 10 % de solución de cloruro de litio, y solución acuosa saturada de bicarbonato sódico de nuevo. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y concentró al vacío. El resto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 40 g eluyéndola con un 0-10 % de metanol/DCM para dar el compuesto **15** (261 mg, 0,281 mmol, un 68,2 % de rendimiento) como una espuma transparente. MS(ESI) m/z 929 $(M+H)^+$.

Compuesto **16**. Una solución del compuesto **15** (261 mg, 0,281 mmol) y un 10 % de Pd/C (Aldrich, 1,495 mg, 0,014 mmol) en MeOH (3 ml) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno (en un globo) durante 2 h. El vaso de reacción se aclaró con nitrógeno y se añadió medio de filtro CELITE™. La mezcla se filtró a través de una placa fina de medio de filtro CELITE™ y se lavó con metanol. El filtrado se concentró y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía de flash utilizando una columna Isco de 40 g eluyéndola con un 0-20 % de metanol/DCM. El aceite resultante se liofilizó a partir de acetonitrilo/agua para dar el compuesto **16** (206 mg, 0,238 mmol, un 85 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^{1}HNMR (DMSO) δ 8,21(t, 1H), 7,92(d, 2H), 7,80(t, 1H), 7,75(d, 2H), 6,75(t, 1H), 6,03(t, 1H), 5,45(s, 2H), 4,51(t, 1H), 2,81-3,65(m, 25H), 2,30(t, 2H), 162-1,89(m, 8H), 1,35(s, 9H), 1,24(t, 2H), 0,92(dd, 6H); MS(ESI) m/z 839 $(M+H)^+$.

Compuesto **18**. A una solución del compuesto **16** (35 mg, 0,042 mmol), 2-(3H-[1,2,3]triazol[4,5-b] piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilsouroniohexafluorofosfato (V) (HATU, Oakwood, 12,69 mg, 0,033 mmol) en DMF (1 ml), se añadió DIPEA para ajustar el pH por encima de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. A esto se añadió el compuesto **17** (documento US 8.852.599; 19,68 mg, 0,042 mmol). Se añadió DIPEA adicional para ajustar el pH de la mezcla de reacción por encima de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis de HPLC mostraba que la reacción estaba completada. La mezcla de reacción se 56 purificó mediante una HPLC de preparación con un 10-65 % de acetonitrilo en agua (con un 0,1 % de TFA, 20 ml/min) sobre una columna Phenomenex Gemini 5m, C18 150x21,2 mm. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se secaron por congelación para dar el compuesto **18** (21 mg, 0,016 mmol, un 49,34 %) MS(ESI) m/z 1292 $(M+H)^+$.

Donante de amina (A). A una solución del compuesto **18** (21 mg) en DCM (1 ml), se añadió TFA (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min, se concentró y purificó mediante HPLC de preparación con un 10-65 % de acetonitrilo en agua (con un 0,1 % de TFA, 20 ml/min) en columna Phenomenex Gemini 5m, C18 150x21,2 mm. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se congelaron por congelación para dar el donante de amina (A) (16 mg, 0,013 mmol, un 81,3 %). ^{1}HNMR (DMSO) δ 11,95(s, 1H), 10,54(s, 1H), 10,18(s, 1H), 8,85(s, 1H), 8,36(s, 1H), 8,31(s, 1H), 7,20-8,31(m, 12H), 6,23(s, 1H), 5,48(s, 1H), 3,99-4,95(m, 7H), 2,10-3,99(m, 28H), 1,28-1,85(m, 8H), 0,92(dd, 6H); MS(ESI) m/z 1192 $(M+H)^+$.

Ejemplo 3 – Actividad del conjugado producido mediante el procedimiento de una etapa

La **Fig. 2** muestra la actividad de un conjugado producido por el proceso de conjugación de una etapa. El anticuerpo era el anticuerpo CD70-b (véase el Ejemplo 1 anteriormente), que tiene una extensión EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) en el extremo C y el fármaco era el donante de amina (A) (véase el Ejemplo 3 anterior). La DAR era 3,9. La actividad se ensayó contra las células 786-O, una línea celular del carcinoma renal humano que expresa CD70, en un modelo tumoral de ratón SCID. Como muestran los trazos, el conjugado era eficaz en la supresión del crecimiento tumoral.

Ejemplo 4 – Actividad de los conjugados producidos por el procedimiento de dos etapas

El anticuerpo CD70-a (véase el Ejemplo 1 anterior), que tiene una extensión EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) en el extremo C, se conjugó con un análogo de tubulisina como fármaco, utilizando un procedimiento de dos etapas. Los análogos de tubulisina adecuados se describen en Cheng et al., documento US 8.394.922 B2 (2013); y Cong et al., documento US 2014/0227295 A1 (2014). El par complementario de grupos funcionales reactivos eran una azida como R^1 y ciclooctina como R^2. La DAR era 1,8.

De manera análoga, se modificó el anticuerpo anti-mesotelina 6A4 (Terrett et al. 2012) con una extensión EEQYASTY (SEQ ID NO: 1) en el extremo C y entonces se conjugó con el mismo análogo de tubulisina del procedimiento de dos etapas, para dar lugar a un conjugado con una DAR de 1,6.

La eficacia de los dos conjugados se ensayaron contra células N87, una línea de cáncer gástrico que expresa mesotelina, pero no CD70. Los resultados se muestran en la **Fig. 3**. El conjugado CD70 era mucho menos eficaz contra las células N87, como se podía esperar debido a que no expresan CD70.

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

Las citas completas de las siguientes referencias citadas de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anteriormente en la presente memoria descriptiva se proporcionan a continuación.

Bregeon et al., documento US 2013/0189287 A1 (2013).

Bregeon, documento WO 2014/202773 A1 (2014).

Bregeon et al., documento WO 2014/202775 A1 (2014).

Chen et al., documento US 2005/0136491 A1 (2005).

Coccia et al., documento US 2010/0150950 A1 (2010).

Dennler et al., Bioconjug. Chem. 2014, 25, 569-578.

Fischer et al., documento WO 2014/072482 A1 (2014).

Fontana et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2008, 60, 13-18.

Innate Pharma, "A New Site Specific Antibody Conjugation Using Bacterial Transglutaminase," presentación en el ADC Summit, San Francisco, California, oct. 15, 2013.

Jeger et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9995.

Kamiya et al., documento US 2011/0184147 A1 (2011).

Lin et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4542-4543.

Liu et al., documento US 8.865.875 B2 (2014).

Mero et al., Bioconjug. Chem. 2009, 384-389.

Mindt et al., Bioconjug. Chem. 2008, 19, 271-278.

Pons et al., documento US 2013/0230543 A1 (2013).

Sato et al., documento US 6.322.996 B1 (2001).

Sato, Adv. Drug Deliv. Rev. 2002, 54, 487-504.

Schibli et al., documento US 2007/0184537 A1 (2007).

Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc. 2006, 5, 147.

Strop et al., Chemistry & Biology 2013, 20, 161-167.

Sugimura et al., J. Biotechnol. 2007, 131, 121-127.

Terrett et al., documento US 8.268.970 B2 (2012).

Zhang et al., documento US 8.852.599 B2 (2014).

LISTADO DE SECUENCIAS

Se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad un listado de secuencias denominado "SEQT_12452WOPCT.txt," que comprende las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 8, que incluye secuencias de ácido nucleico o aminoácidos desveladas en el presente documento. El listado de secuencias se ha remitido con el presente documento en formato de texto ASCII mediante EFS-Web, y por lo tanto constituye una forma en papel y que se puede leer por computadora de las mismas. El listado de secuencia se creó en primer lugar utilizando PatentIN 3.5 el 25 de febrero de 2015, y tiene aproximadamente 20 KB de tamaño.

La siguiente Tabla II resume las descripciones de las secuencias desveladas en la presente solicitud.

Tabla II - Resumen de secuencias

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS
1	Aminoácidos, Extensión del extremo C
2	Aminoácidos, Extensión del extremo C
3	Aminoácidos, Extensión del extremo C
4	Aminoácidos, variante de IgG1
5	Ácido nucleico, región constante de cadena pesada modificada
6	Aminoácidos, región constante de cadena pesada modificada
7	Ácido nucleico, región constante de cadena pesada modificada
8	Aminoácidos, región constante de cadena pesada modificada

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> Anticuerpos que se pueden conjugar mediante una transglutaminasa y conjugados producidos a partir de estos

<130> 12452-WO-PCT

<150> US 62/130673

<151> 10-03-2015

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EEQYASTY en el extremo C

<400> 1

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EEQYQSTY en el extremo C

<400> 2

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EEQYNSTY en el extremo C

<400> 3

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
1 5

<210> 4
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de IgG1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (330)..(330)
<223> Presencia opcional

<400> 4

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
```

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 5
<211> 1020
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC con EEQYASTY en el extremo C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1020)

<400> 5

```
gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag        48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac        96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc       144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc       192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc       240
```

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag        288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc        336
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca        384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc        432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg        480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag        528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg        576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac        624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg        672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag        720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat        768
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac        816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc        864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac        912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg        960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
```

```
cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa gag gag cag tac gcg agc        1008
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
                325                 330                 335

acg tac cgt tag                                                    1020
Thr Tyr Arg
```

<210> 6
<211> 339
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
```

```
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
                325                 330                 335

Thr Tyr Arg
```

<210> 7
<211> 1020
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC con EEQYQSTY en el extremo C

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1020)

<400> 7

```
gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag        48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac        96
```

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc        144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc        192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc        240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag        288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc        336
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca        384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc        432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg        480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag        528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg        576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac        624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg        672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag        720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat        768
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac        816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
```

```
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc        864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac        912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg        960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa gag gag cag tac cag agc       1008
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Glu Gln Tyr Gln Ser
                325                 330                 335

acg tac cgt tag                                                      1020
Thr Tyr Arg
```

<210> 8
<211> 339
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
```

```
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Glu Gln Tyr Gln Ser
                325                 330                 335

Thr Tyr Arg
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de longitud completa, en el que al menos una cadena pesada tiene una extensión en el extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3), EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6) o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2).

2. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3).

3. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYASTY (SEQ ID NO: 1).

4. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2).

5. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3).

6. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6) o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2).

7. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, que es del isotipo IgG1.

8. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una región constante que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.

9. Un método de producción de un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo de longitud completa, al menos una de cuyas cadenas pesadas tiene una extensión del extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3);
(b) proporcionar un donante de amina de fórmula

NH_2-X-D,

en la que D representa un fármaco y X representa un enlazador bivalente que conecta el fármaco D y el grupo amino NH_2;
(c) poner en contacto el anticuerpo y el donante de amina en presencia de una transglutaminasa; y
(d) permitir que el anticuerpo y el donante de amina formen el conjugado anticuerpo-fármaco mediante la formación de un enlace amida entre una glutamina de la extensión del extremo C y el grupo amino NH_2 del donante de amina.

10. Un método de producción de un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo de longitud completa, al menos una de cuyas cadenas pesadas tiene una extensión del extremo C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2) o EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3);
(b) proporcionar un donante de amina de fórmula

$$NH_2\text{-}X^1\text{-}R^1,$$

en donde R^1 representa un primer grupo funcional reactivo que es un grupo azida, un grupo dibenzoazaciclooctina, un grupo maleimida, un grupo tiol, un grupo hidroxilamina o un grupo cetona, y X^1 representa un enlazador bivalente que conecta el grupo funcional reactivo R^1 y un grupo amino NH_2;
(c) poner en contacto el anticuerpo y el donante de amina en presencia de transglutaminasa;
(d) permitir que el anticuerpo y el donante de amina formen un anticuerpo modificado que tiene unido al mismo un primer grupo funcional reactivo R^1, mediante la formación de un enlace amida entre una glutamina de la extensión del extremo C y el grupo amino NH_2 del donante de amina;
(e) poner en contacto el anticuerpo modificado con un fármaco que contenga el resto de fórmula

$$R^2\text{-}X\text{-}D,$$

en el que R^2 es un segundo grupo funcional reactivo que reacciona covalentemente con el primer grupo funcional reactivo R^1, D es un fármaco y X es un enlazador bivalente que conecta el fármaco D y el segundo grupo funcional reactivo R^2; en donde R^2 es un grupo dibenzoazaciclooctina cuando R^1 es un grupo azida, R^2 es un grupo azida cuando R^1 es un grupo dibenzoazaciclooctina, R^2 es un grupo tiol cuando R^1 es un grupo maleimida, R^2 es un grupo maleimida cuando R^1 es un grupo tiol, R^2 es un grupo cetona cuando R^1 es un grupo hidroxilamina o R^2 es un grupo hidroxilamina cuando R^1 es un grupo cetona; y

(f) permitir que el primer y segundo grupos funcionales reactivos R^1 y R^2 reaccionen para formar el conjugado anticuerpo-fármaco.

11. Un conjugado anticuerpo-fármaco en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un resto del fármaco mediante un enlace amida en la cadena lateral de un resto de glutamina en una extensión del extremo C de una cadena pesada del anticuerpo, teniendo la extensión del extremo C, una secuencia de aminoácidos que comprende EEQYASTY (SEQ ID NO: 1), EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2), EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3), EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6) o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2).

12. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYASTY (SEQ ID NO: 1).

13. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYQSTY (SEQ ID NO: 2).

14. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYNSTY (SEQ ID NO: 3).

15. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la extensión del extremo C tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en EEQYQS (aminoácidos 1 a 6 de SEQ ID NO: 2), EEQYQST (aminoácidos 1 a 7 de SEQ ID NO: 2), EQYQSTY (aminoácidos 2 a 8 de SEQ ID NO: 2), QYQS (aminoácidos 3 a 6 de SEQ ID NO: 6), o QYQSTY (aminoácidos 3 a 8 de SEQ ID NO: 2).

Fig. 1a

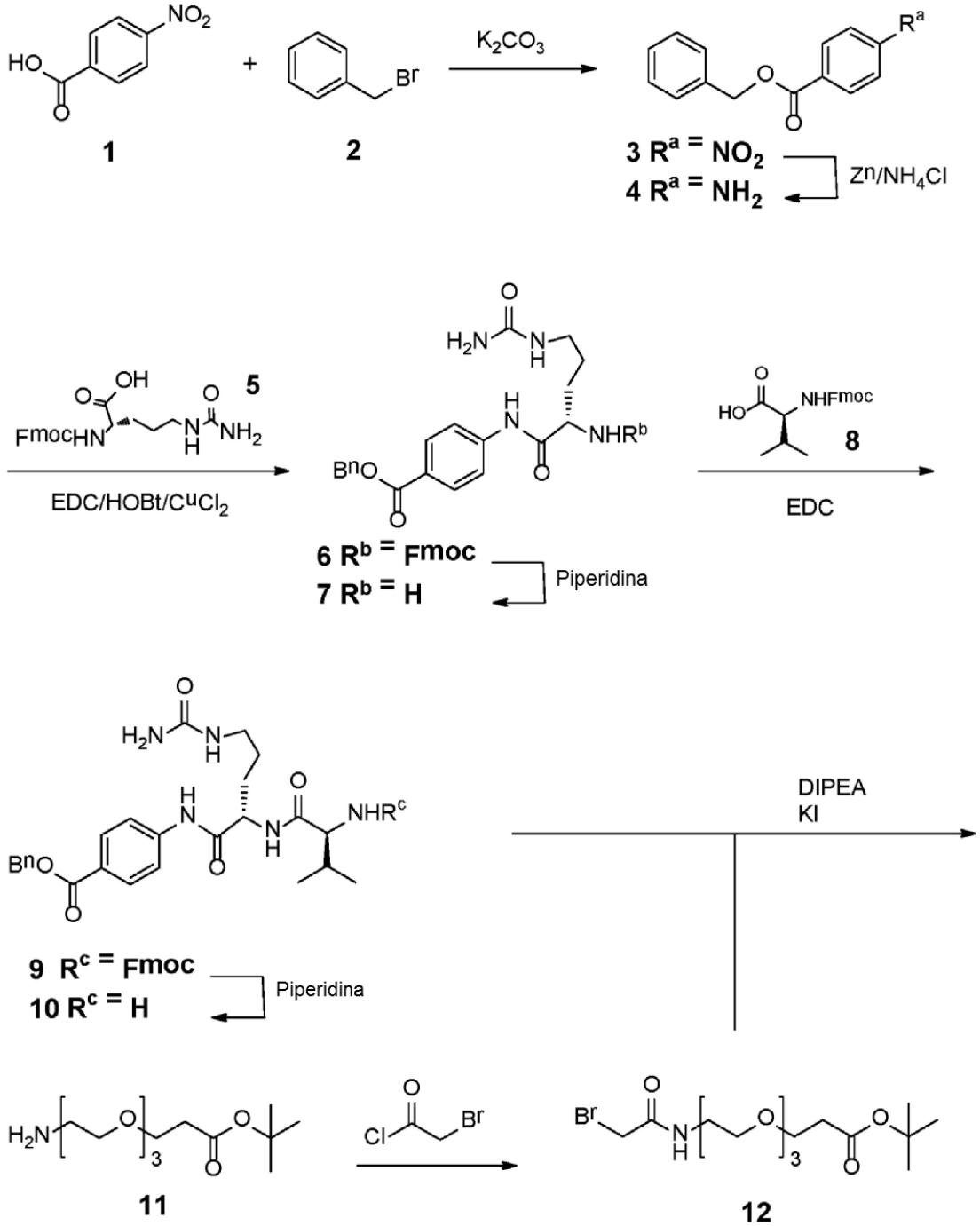

NO2
HO
Br
K2CO3
Ra
1
2
3 Ra = NO2
4 Ra = NH2
Zn/NH4Cl
5
OH
FmocHN
NH2
EDC/HOBt/CuCl2
BnO
NHRb
6 Rb = Fmoc
7 Rb = H
Piperidina
NHFmoc
8
EDC
NHRc
9 Rc = Fmoc
10 Rc = H
Piperidina
DIPEA
KI
11
12

Fig. 1b

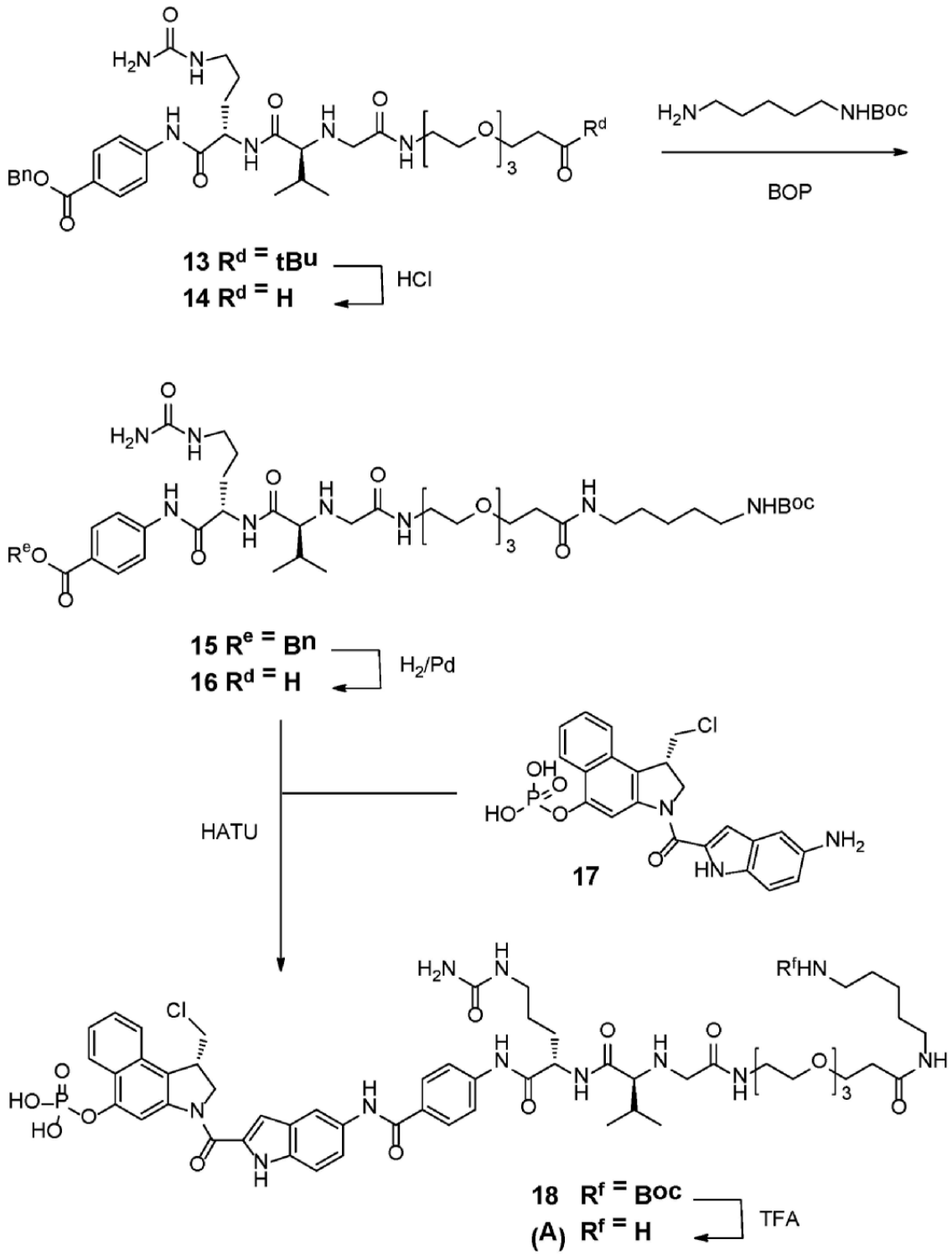

BOP
13 Rd = tBu
14 Rd = H
HCl
15 Re = Bn
16 Rd = H
H2/Pd
HATU
17
18 Rf = Boc
(A) Rf = H
TFA

Fig. 2

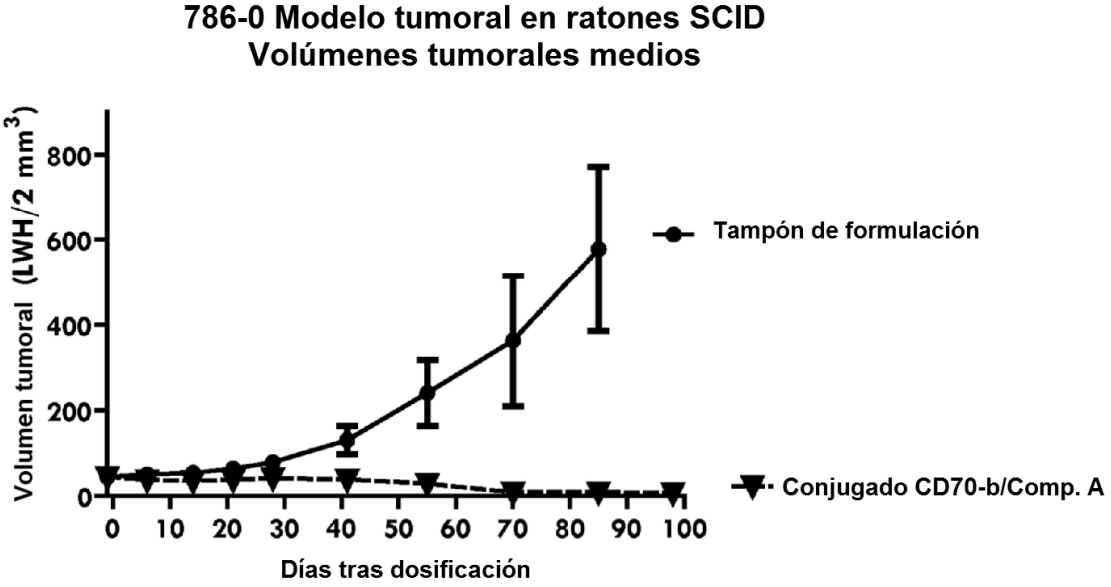
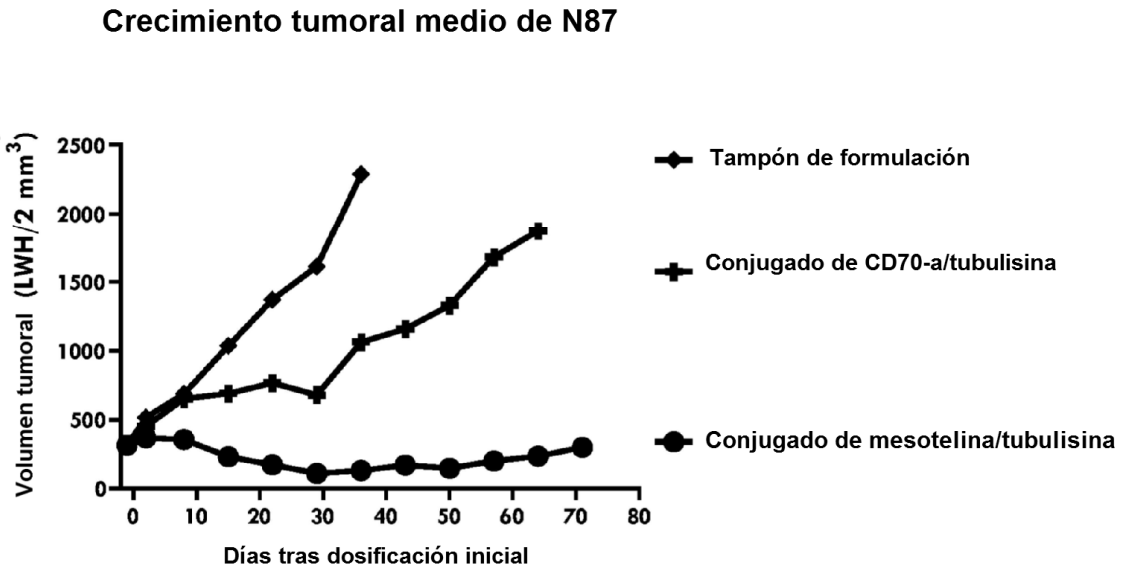

786-0 Modelo tumoral en ratones SCID
Volúmenes tumorales medios
Volumen tumoral (LWH/2 mm3)
800
600
400
200
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Días tras dosificación
Tampón de formulación
Conjugado CD70-b/Comp. A

Fig. 3


Crecimiento tumoral medio de N87
Volumen tumoral (LWH/2 mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Días tras dosificación inicial
Tampón de formulación
Conjugado de CD70-a/tubulisina
Conjugado de mesotelina/tubulisina